



(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 21 982 T2** 2005.12.29

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 073 770 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 21 982.5**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP99/02963**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 924 858.6**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/057311**
(86) PCT-Anmeldetag: **30.04.1999**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **11.11.1999**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **07.02.2001**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **17.11.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.12.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C12Q 1/68**
C12N 15/10

(30) Unionspriorität:
70590 **30.04.1998** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, NL, SE

(73) Patentinhaber:
Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V., 14195 Berlin, DE

(74) Vertreter:
Dreiss, Fuhlendorf, Steimle & Becker, 70188 Stuttgart

(72) Erfinder:
CAHILL, Dolores, Dublin, IE; BÜSSOW, Konrad, D-12167 Berlin, DE; WALTER, Gerald, 06300 Nice, FR; LEHRACH, Hans, 14129 Berlin, DE

(54) Bezeichnung: **NEUARTIGES VERFAHREN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON KLONEN MIT EINER GEWÜNSCHTEN BIOLOGISCHEN EIGENSCHAFT, AUSGEHEND VON EINER EXPRESSIONSGENBANK**

Beschreibung

[0001] Proteine sind in Funktionseinheiten translatierte Genomsequenzinformationen, die biologische Prozesse ermöglichen. Anfängliche Versuche, das große und komplexe menschliche Genom zu sequenzieren, zielten absichtlich auf exprimierte Regionen, wie sie die cDNA-Repertoires darstellen (Adams et al., Nature 377 (1995), 35–174S). In der Zwischenzeit wurden für die meisten menschlichen Gene exprimierte Sequenz-Tags (ESTs) in die Nukleotiddatenbanken eingespeist (Wolfsberg et al., Nucl. Acids Res. 25 (1997), 1626–1632). Bislang wurde jedoch nur einer Minderheit dieser Sequenzen eine Funktion zugeordnet (Strachan et al., Nature Genet. 16 (1997), 126–132). Die direkteste Lösung dieser Diskrepanz zwischen Struktur und Funktion scheint die direkte Korrelation zwischen dem Funktionsstatus eines Gewebes und der Expression bestimmter Gensets zu sein. Die Technologie zur Erreichung dieses Ziels auf verschiedenen Ebenen der Genexpression ist heute verfügbar. Auf der Transkriptionsebene wurden Genexpressionsmuster durch Hybridisierung komplexer Sonden (DeRisi et al., Science 278 (1997), 680–686; Schena et al., Science 270 (1995), 467–470; Bernard et al., Nucl. Acids Res. 24 (1997), 1435–1442; Mallo et al., Int. J. Cancer 74 (1997), 35–44) oder Sets kurzer Oligonukleotide (Velculescu et al., Science 270 (1995), 484–487) in cDNA-Anordnungen, den SAGE-Sequenzierungsansatz (Wodicka et al., Nature Biotechnol. 15 (1997), 1359–1367) oder Hybridisierung in Oligonukleotidanordnungen (Maier et al., Drug Discovery Today 2 (1997), 315–324) analysiert.

[0002] Auf der Translationsebene erfolgte eine hochauflösende Kartierung von Proteinextrakten auf zweidimensionalen Gelen (Klose et al., Electrophoresis 16 (1995), 1034–1059). Anschließend wurde die massenspektrometrische Analyse von Proteinspots angewendet, um Sequenzinformationen zu erhalten. (Clauser et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 5072–5076). Leffers et al. beschrieben die klonale cDNA-Expression in Säugetierzellen und den Abgleich der Proteinprodukte mit zweidimensionalen Elektrophoresemustern von Zellproteinen (Leffers et al., Electrophoresis 17 (1996), 1713–1719). Gepoolte Klone einer geordneten cDNA-Bibliothek wurden durch in vitro-Transkription/Translation exprimiert und mittels zweidimensionaler Elektrophorese analysiert (Lefkovits et al., Appl. Theor. Electrophor. 5 (1995), 35–42; Behar et al., Appl. Theor. Electrophor. 5 (1995), 99–105; Lefkovits et al., Appl. Theor. Electrophor. 5 (1995), 43–47. Lehrach et al. (Nucl. Acids Res. 38 (1998), 8) beschrieben Anordnungen von Klonen von cDNA-Bibliotheken auf Hochdichtefiltergittern. Lehrach et al. lehren jedoch nicht die Verwendung von Bibliotheken von Fusionsproteinen, wie sie in der vorliegenden Erfindung erforderlich sind, bzw. weisen nicht darauf hin. Herstellung und Screening von Fusionsproteinbibliotheken wurden von Ikeda et al. (Gene 181, (1996) 167–171) beschrieben. Ikeda et al. beschreiben jedoch keine in Gitterform angeordneten Klone oder Proteine bzw. weisen nicht darauf hin.

[0003] Bislang ist keine Technik verfügbar, mit der man auf der Ebene des gesamten Genoms direkt von der DNA-Sequenzinformation auf einzelnen Klonen zu Proteinprodukten und wieder zurück gelangen kann. Ein solches Verfahren wäre insbesondere für die Analyse biologischen Materials im großtechnischen Maßstab wichtig.

[0004] Die für die Analyse eines solchen Materials im großtechnischen Maßstab erwogenen Verfahren aus dem Stand der Technik sind recht umständlich und zeitaufwendig und liefern außerdem grundsätzlich eine unangemessen große Anzahl an falschpositiven Klonen. Dementsprechend war das der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende technische Problem die Bereitstellung eines Verfahrens, das die zuvor genannten Probleme überwindet und insbesondere die Anzahl der falschpositiven Klone in Bibliotheken-Screenings vor allem auf der Ebene der Säugetiergenome signifikant reduziert. Die Lösung des technischen Problems wird durch Bereitstellung der in den Ansprüchen charakterisierten Ausführungsformen erreicht.

Zusammenfassung der Erfindung

[0005] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein neuartiges Verfahren zur Identifizierung und/oder Charakterisierung von Klonen, die eine gewünschte biologische Eigenschaft von einer Expressionsbibliothek verleihen. Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst den Schritt des Analysierens auf die Expression mindestens eines (Poly)peptids, z.B. eines als Fusionsprotein exprimierten Tags, zusammen mit einem rekombinanten Insert eines Klons der Expressionsbibliothek, wobei die Klone der Expressionsbibliothek in einer Anordnung arrangiert sind. Das (Poly)peptid kann an seinem N- oder C-Ende mit dem Insert fusioniert sein. Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst weiterhin die Schritte des Inkontaktbringens eines Liganden, der mit einem (Poly)peptid spezifisch interagiert, das durch das Insert eines Klons exprimiert wird, der die gewünschte biologische Eigenschaft verleiht, mit einer ersten Kopie der in einer Anordnung arrangierten Bibliothek von Klonen und der Analyse der Bibliothek von Klonen auf das Vorliegen einer Interaktion, und/oder der Durchführung einer Hybridisierung oder eines Oligonukleotid-Fingerprints mittels einer für das Insert eines Klons, der die gewünschte biologische Eigenschaft verleiht, spezifischen Nukleinsäuresonde, mit einer zweiten Kopie der in ei-

ner Anordnung arrangierten Bibliothek von Klonen sowie der Analyse der Bibliothek von Klonen auf das Vorliegen einer spezifischen Hybridisierung. Schließlich erfordert das erfindungsgemäße Verfahren die Identifizierung von Klonen, wobei eine Expression des mindestens einen (Poly)peptids in Schritt (a) und/oder eine Interaktion in Schritt (b) und/oder eine Hybridisierung oder ein Oligonukleotid-Fingerprint in Schritt (c) nachgewiesen werden kann. Die vorliegende Erfindung bezieht sich außerdem auf ein für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens nützliches Kit.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0006] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Identifizierung und/oder Charakterisierung von Klonen einer Expressionsbibliothek, wobei die Klone eine gewünschte biologische Eigenschaft verleihen, umfassend die folgenden Schritte:

(a)Analysieren auf die Expression von mindestens einem als Fusionsprotein mit einem Expressionsprodukt eines rekombinanten Inserts eines Klons der Expressionsbibliothek exprimierten (Poly)peptids, wobei die Klone der Expressionsbibliothek in einer Anordnung arrangiert sind; und

(b)Inkontaktbringen eines Liganden, der mit einem (Poly)peptid spezifisch interagiert, das durch das Insert eines Klons exprimiert wird, der die gewünschte biologische Eigenschaft verleiht, mit der Bibliothek oder einer ersten Kopie der Bibliothek von Klonen in einer Anordnung und Analysieren der Bibliothek von Klonen auf das Vorliegen einer Interaktion; und/oder

(c)Durchführen einer Hybridisierung oder eines Oligonukleotid-Fingerprints mit einer für das Insert eines Klons, der die gewünschte biologische Eigenschaft verleiht, spezifischen Nukleinsäuresonde mit der Bibliothek oder einer ersten Kopie oder einer zweiten Kopie der in einer Anordnung arrangierten Bibliothek von Klonen und Analysieren der Bibliothek von Klonen auf das Vorliegen einer Hybridisierung; und

(d)Identifizieren und/oder Charakterisieren von Klonen, wobei eine Expression des mindestens einen (Poly)peptids in Schritt (a) und/oder eine Interaktion in Schritt (b) und/oder eine Hybridisierung oder ein Oligonukleotid-Fingerprint in Schritt (c) nachgewiesen werden kann.

[0007] Der Begriff „rekombinantes Insert", wie er erfindungsgemäß verwendet wird, bezeichnet ein Nukleinsäurefragment, das in dem zur Herstellung der Expressionsbibliothek erzeugten Expressionsvektor vorliegt, so dass es zusammen mit dem mindestens ein (Poly)peptid codierenden Nukleinsäurefragment einen offenen Leserahmen liefert, wobei die Expression des offenen Leserahmens zu dem Fusionsprotein führt.

[0008] Der Begriff „Klon einer Expressionsbibliothek", wie er im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet wird, bezeichnet alle vermehrbaren, im Wesentlichen klonalen biologischen Materialien, die rekombinantes genetisches Material enthalten und Teil einer Expressionsbibliothek sind. Typischerweise bezieht sich dieser Begriff auf transformierte Bakterien, kann sich jedoch auch auf andere Transformanten oder rekombinantes Virenmaterial oder Bakteriophagen beziehen. Der Begriff „Expressionsbibliothek" ist im Stand der Technik geläufig (siehe z.B. Sambrook et al., „Molecular Cloning, A Laboratory Handbook", 2. Ausgabe (1989), CSH Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Vorzugsweise kann die Expressionsbibliothek durch einen Induktor induziert werden. Induktoren sind im Stand der Technik bekannt und schließen z.B. IPTG ein. Im Stand der Technik sind verschiedene Arten von Expressionsbibliotheken bekannt, die die vorliegende Erfindung allesamt umfasst. Ein bevorzugter Bibliothekstyp ist eine durch Exon-Trapping entstandene Bibliothek oder eine in einem Shuttle-Vektor entstandene Bibliothek, z.B. einem Vektor, der in prokaryontischen und eukaryontischen Systemen oder in multiplen prokaryontischen und/oder in multiplen eukaryontischen Systemen eingesetzt werden kann. Weiterhin ist bekannt, dass Expressionsbibliotheken aus einer großen Vielfalt an Quellen erstellt werden können. Die vorliegende Erfindung sieht die Verwendung aller Quellen für das zuvor genannte Verfahren vor. Solche Quellen können z.B. Säugetier- oder andere eukaryontische Zellen, Gewebe, Bakterien, andere Mikroorganismen, Pflanzen, Hefe, Blut oder Zelllinien sein.

[0009] Der Begriff „gewünschte biologische Eigenschaft" soll funktionelle sowie nicht-funktionelle biologische Eigenschaften wie z.B. Struktureigenschaften umfassen. Funktionelle Eigenschaften können z.B. Bindungseigenschaften sein, wie sie Antikörper oder Fragmente oder Derivate davon verleihen. Alternativ können sich funktionelle Eigenschaften auf den Umsatz von Targetmolekülen beziehen, wie er z.B. durch Enzymaktivitäten bereitgestellt wird. Andererseits können sich nicht-funktionelle Eigenschaften auf die Primärstruktur einer Nukleinsäure beziehen, die beispielsweise durch Nukleinsäurehybridisierung nachgewiesen werden kann.

[0010] Der Begriff „(Poly)peptid" bezieht sich sowohl auf Peptide als auch auf Polypeptide, die natürlich vorkommen oder rekombinant sind, chemisch oder anderweitig hergestellt oder modifiziert werden, die dreidimensionale Struktur von Proteinen annehmen und posttranslational verarbeitet werden können, wahlweise auf im Wesentlichen dieselbe Weise wie native Proteine.

[0011] Der Begriff „Fusionsprotein" bezeichnet alle Polypeptide, die aus mindestens zwei (Poly)peptiden bestehen oder diese umfassen, die auf natürliche Weise kein solches Polypeptid bilden. Auf der DNA-Ebene werden zwei oder mehr Codiersequenzen im Rahmen fusioniert.

[0012] Der Begriff „Anordnung", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf alle regelmäßigen oder unregelmäßigen replizierbaren Formen. Regelmäßige Formen, insbesondere Hochdichtegitter, wie sie z.B. in Lehrach et al., Interdisciplinary Science Reviews 22 (1997), 37–44 beschrieben sind, werden bevorzugt.

[0013] Der Begriff „Ligand", wie er hierin verwendet wird, umfasst alle Arten von Molekülen, die aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur mit einem gewünschten (Poly)peptid spezifisch interagieren können. Je nach der dreidimensionalen Struktur kann der Ligand auch nicht-spezifisch mit durch die rekombinanten Inserts exprimierten (Poly)peptiden interagieren. Ein typisches Beispiel für einen Liganden ist ein Antikörper oder ein anderer Rezeptor wie z.B. ein Hormonrezeptor. Ein typisches Beispiel für eine nichtspezifische Interaktion eines Antikörpers ist eine Kreuzreaktion.

[0014] Der Begriff „Hybridisierung" mit einer Nukleinsäuresonde bezieht sich auf eine spezifische oder nicht-spezifische Hybridisierung. Ob eine Hybridisierung spezifisch oder nichtspezifisch ist, hängt von den Stringenzbedingungen ab, wie im Stand der Technik bekannt. Der Begriff „spezifische Hybridisierung" bezieht sich auf stringente Bedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen können gemäß den in Sambrook, „Molecular Cloning, A Laboratory Handbook", 2. Ausgabe (1989), CSH Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubel, „Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989); oder Higgins und Hames (Hrsg.) „Nucleic acid hybridization, a practical approach" IRL Press Oxford, Washington DC (1985) beschriebenen herkömmlichen Protokollen hergestellt werden. Ein Beispiel für spezifische Hybridisierungsbedingungen ist die Hybridisierung in 4 × SSC und 0,1% SDS bei 65° C mit anschließendem Waschen in 0,1 × SSC, 0,1% SDS bei 65° C. Alternativ sind stringente Hybridisierungsbedingungen z.B. 50% Formamid, 4 × SSC bei 42° C. Nicht-spezifische Bedingungen beziehen sich z.B. auf eine Hybridisierung in 4 × SSC, 1% SDS bei 50° C und Waschen unter denselben Bedingungen.

[0015] Erfindungsgemäß können Schritt (b) und/oder Schritt (c) mit der Bibliothek und/oder einer ersten Kopie und/oder einer zweiten und/oder einer weiteren Kopie der Bibliothek durchgeführt werden. Wird die Bibliothek oder die erste, zweite oder weitere Kopie in zwei verschiedenen Schritten verwendet, können alle in Schritt (a) und/oder (b) zugegebenen Materialien, die die nachfolgenden Schritte stören könnten, vor Durchführung des nachfolgenden Schrittes wahlweise entfernt werden, vorzugsweise gemäß herkömmlicher Protokolle.

[0016] Der Begriff „Klonidentifizierung" umfasst alle Arten von Identifizierungsschritten, die sich für die Identifizierung des Klons von Interesse eignen. Klone können z.B. mittels optischer Mittel identifiziert werden, wenn z.B. das als Fusionsprotein mit dem rekombinanten Insert exprimierte (Poly)peptid grünfluoreszierendes Protein ist und der Ligand oder die Sonde mit einer optisch erkennbaren Markierung markiert ist, z.B. alkalischer Phosphatase, Meerrettich-Peroxidase oder FITC. Weiterhin können positive Klone durch die im Stand der Technik bekannte Blau/Weiß-Selektion identifiziert werden. Alternativ kann die Einwirkung eines Röntgenfilms bei der Identifizierung des gewünschten Klons helfen, wenn die Nukleinsäuresonde radioaktiv markiert ist. Die Klone können auch mittels Massenspektrometrie identifiziert werden.

[0017] Der Begriff „Oligonukleotid-Fingerprint" beschreibt die Erzeugung eines durch Analyse des Hybridisierungsmusters (Hybridisierung/keine Hybridisierung) – erhalten durch Hybridisierung einer Reihe von Oligonukleotiden mit der Nukleinsäure, vorzugsweise DNA – gewonnenen sequenzabhängigen, reproduzierbaren, statistisch signifikanten Sequenzmusters oder -fingerprints.

[0018] Das erfindungsgemäße Verfahren weist signifikante Vorteile gegenüber Verfahren aus dem Stand der Technik auf und eignet sich besonders für die effiziente Analyse von Säugetier- und/oder Pflanzen- und/oder anderen eukaryontischen Genomen, kann jedoch natürlich auch auf die Analyse anderer Expressionsbibliotheken angewandt werden, z.B. genomischer DNA-Expressionsbibliotheken von prokaryontischen oder anderen Mikroorganismen. Dieses neue Verfahren reduziert das Hintergrundrauschen falsch-positiver Klone beim Durchsuchen der Expressionsbibliotheken signifikant. Insbesondere beim Durchsuchen einer oder mehrerer Bibliotheken nach einer großen Anzahl von Klonen kann die zeitaufwendige Arbeit der Identifizierung von Klonen, die sich schließlich als die gewünschten biologischen Eigenschaften nicht besitzend erweisen, vermieden werden. Dies führt natürlich auch zu einer signifikanten Reduktion des Kostenfaktors bei der Genom- und/oder Proteomanalyse. Ein weiterer besonderer Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, dass der Wissenschaftler beim Durchsuchen seiner Bibliothek nach den gewünschten Klonen die Wahl hat, zwischen einer Nukleinsäuresonde und einem Liganden zu wählen. Die Kombination der Schritte (a), (b) und (c) verbessert die Zuverläs-

sigkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens bei der Identifizierung der tatsächlich gewünschten Klone weiter. Überraschenderweise konnte erfindungsgemäß gezeigt werden, dass das nachweisbare (Poly)peptid selbst nach dem ursprünglichen Spotten der Transformanten in einer Anordnung und dem nachfolgenden Koloniewachstum ohne Störung der Anordnungsstruktur noch nachgewiesen werden kann. Dies gilt auch, wenn die Kolonien etwa 18 Stunden lang kultiviert wurden.

[0019] Bezüglich des als Fusionsprotein mit einem rekombinanten Insert eines Klons der Expressionsbibliothek exprimierten (Poly)peptids ist anzumerken, dass die vorliegende Erfindung die Verwendung eines oder mehrerer in das Fusionsprotein eingebauter (Poly)peptide vorsieht. Wie aus den beigefügten Beispielen ersichtlich, erlaubt die Fusion des (Poly)peptids mit dem N-Ende den Nachweis im Rahmen exprimierter Inserts, da Inserts, die sich nicht im Rahmen mit dem N-terminalen (Poly)peptid befinden, grundsätzlich rasch im Zytoplasma abgebaut werden. Andererseits erlauben die Fusion des (Poly)peptids mit dem C-Ende und der Nachweis des (Poly)peptids die Auswahl von Inserts voller Länge. Die vorliegende Erfindung sieht außerdem die Kombination von einem oder mehreren mit dem N-Ende und C-Ende des Inserts fusionierten (Poly)peptiden vor.

[0020] Es ist anzumerken, dass die Klone vor Durchführung der Schritte (a) bis (d) in dem zu testenden biologischen Material in zugänglicher Form vorliegen sollten. Handelt es sich bei den Klonen z.B. um transformierte Bakterien, müssten diese vorzugsweise lysiert werden. Solche Lyseverfahren sind im Stand der Technik bekannt.

[0021] Aufgrund der Anwendung computergestützter Technologie bei dem erfindungsgemäßen Verfahren muss die Durchsuchung einer Bibliothek nur einmal erfolgen, da die für die einzelnen Klone erzeugten Daten in einer späteren Analyse, z.B. einer Sequenzierung auf dieses Screening zurückgeführt werden können. Dementsprechend ist ein rascher Übergang von einer Expressionsbibliothek wie z.B. einer cDNA-Bibliothek auf eine Proteinbibliothek möglich. Dadurch entsteht eine direkte Verbindung zwischen einem Genkatalog und einem funktionellen Protein/(Poly)peptid-Katalog. Darüber hinaus kann wiederholtes Durchsuchen oder eine verlängerte Durchsuchungsreaktion die Wahrscheinlichkeit des Ausschlusses falsch-positiver Klone weiter erhöhen.

[0022] Erfindungsgemäß kann das Verfahren auch zur Charakterisierung bereits bekannte Nukleinsäuremoleküle eingesetzt werden.

[0023] In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das als Teil eines Fusionsproteins mit dem Expressionsprodukt des rekombinanten Inserts exprimierte (Poly)peptid ein Antikörper oder ein Fragment oder Derivat davon, wobei das Fragment ein $F(ab')_2$-, Fab-, Fv- oder scFv-Fragment ist, oder ein Antikörper, der z.B. durch Deletion bestimmter Teile modifiziert ist, im Wesentlichen jedoch seine Fähigkeit, als Ligand zu funktionieren, beibehält, ein Tag, ein Enzym oder ein Phagenprotein oder ein Fusionsprotein.

[0024] Verfahren zum Nachweis einer Ausführungsform des zuvor näher beschriebenen (Poly)peptids sind im Stand der Technik bekannt bzw. können vom Fachmann ohne Weiteres entwickelt werden. Antikörper können beispielsweise mit Hilfe nachweisbar markierter Anti-Antikörper nachgewiesen werden. Die Antikörperfragmente oder -derivate können $F(ab')_2$-, Fab-, Fv- oder scFv-Fragmente sein (siehe z.B. Harlow und Lane, „Antibodies, A Laboratory Manual", CHS Press (1988), Cold Spring Harbor, N.Y.). Weiterhin können Tags nach herkömmlichen Verfahren nachgewiesen werden. Dasselbe gilt für Enzyme, die beispielsweise durch Umsetzen mit einem spezifischen Substrat und Nachweis z.B. einer Farbreaktion oder durch Verwendung eines für das Enzym spezifischen, nachweisbar markierten Antikörpers nachgewiesen werden können. Antikörper können auch dem Nachweis von Phagen oder Fragmenten davon dienen. Antikörper-Markierungen sind im Stand der Technik ebenfalls bekannt; dazu gehören alkalische Phosphatase (ATTPPHOS), CSPD, Meerrettich-Peroxidase, FITC und Radioaktivität. Der Nachweis einer Ausführungsform des zuvor näher beschriebenen (Poly)peptids kann auch massenspektrometrisch erfolgen.

[0025] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Analyse auf die Expression eines (Poly)peptids in Schritt (a) durch Kontaktaufnahme mit einem Liganden, der sich von dem Liganden von Schritt (b), der mit dem (Poly)peptid spezifisch interagiert, unterscheidet, und Analyse der Bibliothek von Klonen auf das Vorliegen einer spezifischen Interaktion. Der in Schritt (a) eingesetzte Ligand kann aus derselben Klasse von Liganden stammen wie der in Schritt (b) eingesetzte. Die tatsächliche Molekülstruktur des Liganden sollte jedoch in beiden Schritten unterschiedlich sein, um zwischen den beiden Liganden unterscheiden zu können.

[0026] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Analyse auf die Expression eines (Poly)peptids in Schritt (a) mit Hilfe optischer Mittel. Vorteilhafterweise kann die Expression des (Poly)peptids mit Hilfe optischer Mittel wie Fluoreszenz, Biolumineszenz oder Phosphoreszenz nachgewiesen werden. Die entsprechenden Signale können mittels an die Computereinheit angeschlossener photographischer Mittel gespeichert werden. Die entsprechenden Signale können bei Verwendung eines hochauflösenden CCD-Detektionssystems in Bilder umgewandelt, als Bilddateien auf dem Computer gespeichert und mittels anwenderspezifischer Software analysiert werden, um die positiven Klone zu zählen.

[0027] Die optischen Mittel sind am bevorzugtesten Massenspektrometrie. Die massenspektrometrische Analyse der angeordneten Proteine erlaubt z.B. hier die Verwendung der Proteinanordnungen als Brücke zur Verbindung von DNA-, mRNA- und/oder komplexen Hybridisierungsergebnissen mit 2-D-PAGE-Ergebnissen. Dies erfolgt durch Erzeugung von Massenspektren der angeordneten Proteine (z.B. auf einem Chip, einem massenspektrometrischen Target oder einer Matrix) sowie durch Vergleich dieser Massenspektren mit den von den Spots auf 2-D-Gelen erzeugten Massenspektren. Mittels dieses Ansatzes kann das mRNA-Repertoire einer Zelle (über die cDNA-Bibliothek) als erste Ebene der Genexpression, die die Genaktivität am direktesten widerspiegelt, untersucht und mit der Proteomanalyse, d.h. der Analyse des Proteinkomplements einer Zelle, eines Gewebes, einer Pflanze, eines Mikroorganismus und/oder eines Organismus in Verbindung gebracht werden.

[0028] Derzeit werden die isolierten Proteine von 1-D- und 2-D-Gelen in Sequenzdatenbanken mittels Massenspektrometrie identifiziert. Dies ist jedoch eindeutig auf die wenigen bekannten Proteine beschränkt. Vorteilhafterweise wird diese Beschränkung durch das Konzept der vorliegenden Erfindung überwunden, dass nämlich alle durch die Klone der Expressionsbibliotheken exprimierten Proteine durch ein Minimum an Strukturdaten, die als MPI (minimal protein identifier) bezeichnet werden, spezifiziert sind. Der Gehalt an MPIs – Peptidkarten kombiniert mit weiteren Strukturdaten – kann für eine eindeutige Proteinidentifizierung und Hochdurchsatzbestimmung mittels Massenspektrometrie auf zweierlei Weise optimiert werden.

[0029] Nach der Registrierung erleichtern MPIs das Aufspüren von Genprodukten in biologischen Proben durch einfaches Vergleichen der Messdaten. Auf diese Weise ist die Proteinerkennung unabhängig davon, ob das Protein „bekannt" ist (d.h. in den aktuellen Datenbanken vorliegt) oder „unbekannt" (d.h. in den aktuellen Datenbanken nicht vorliegt). Diese Spektren können zur Identifizierung von Spektren verwendet werden, die anschließend bei der Analyse von Proteinen aus anderen Quellen, z.B. von getrennten Proteinen von 1-D- und 2-D-Elektrophoresegelen erzeugt werden.

[0030] Dadurch entsteht eine Brücke, die die durch 2-D-Elektrophorese charakterisierten Proteine mit ihren entsprechenden mRNAs und Genen (cDNAs) verbindet. Alle von 2-D-Gelen gesammelten MPIs werden nach computergestützten Verfahren (in silico) mit den aus der rekombinanten Proteinbibliothek erhaltenen MPIs verglichen und umgekehrt. Dadurch kann zwischen Tausenden biologisch aktiver Genprodukte und ihren Genen eine Verbindung hergestellt werden. Diese Verbindung ist unabhängig von den Sequenzdaten und daher auch für die funktionelle Proteomanalyse anderer Organismen attraktiv.

[0031] Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäßen Strategie im Vergleich zu aktuellen Strategien ist, dass die Proteinidentifizierung zuverlässiger wird, da massenspektrometrische Daten mit massenspektrometrischen Daten verglichen werden und nicht mit aus DNA- oder Proteinsequenzen vorhergesagten Daten. Der Hauptnachteil letzteren Ansatzes ist, dass die substratabhängige Proteaseleistung, Peptidlöslichkeit und endgültige Signalsuppression in der massenspektrometrischen Analyse nicht berücksichtigt werden.

[0032] Darüber hinaus erlauben die erfindungsgemäßen Proteinanordnungen die Untersuchung massenspektrometrischer Daten von Tausenden unterschiedlicher Proteine von 2-D-Gelen durch Einsatz ihrer mit stabilen Isotopen markierten rekombinanten Homologe. Außerdem wird eine unsterbliche Quelle zur Erzeugung von cDNA-Mikroarrays bereitgestellt, mit deren Hilfe durch komplexe Hybridisierung ein Profil der mRNA-Ebenen erstellt werden kann.

[0033] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die biologische Eigenschaft die Spezifität für eine Zelle, ein Gewebe oder das Entwicklungsstadium einer Zelle oder eines Gewebes, eines Mikroorganismus, vorzugsweise eines Bakteriums, einer Pflanze oder eines Organismus.

[0034] In dieser bevorzugten Ausführungsform der Erfindung können spezifische Vergleiche gezogen werden, die dem Wissenschaftler z.B. Informationen über den Entwicklungsstatus einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organismus oder über die Spezifität einer Zelle oder eines Gewebes z.B. bezüglich seines Ur-

sprungs liefern. Dies kann durch Vergleich von zwei Geweben unterschiedlichen Ursprungs auf das Vorliegen bestimmter Markerproteine erfolgen. Bezüglich des Entwicklungsstatus eines Organismus können z.B. Expressionsprofile einer Expressionsbibliothek von angeordneter cDNA eines 6 Tage alten Mäuseembryos und einer Expressionsbibliothek von angeordneter cDNA eines 9 Tage alten Mäuseembryos verglichen werden, um unterschiedlich exprimierte Gene zu identifizieren und zu charakterisieren und so in verschiedenen Entwicklungsstadien exprimierte Gene zu ermitteln.

[0035] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Zelle oder das Gewebe eine normale Zelle oder ein normales Gewebe, eine kranke Zelle oder ein krankes Gewebe oder eine vorbehandelte Zelle oder ein vorbehandeltes Gewebe.

[0036] Der Begriff „vorbehandelt", wie er in Verbindung mit Zellen oder Geweben verwendet wird, soll bedeuten, dass die Zelle oder das Gewebe einem Medikament, einem Aktivator oder einem Liganden, usw. ausgesetzt wurde. Die Vorbehandlung beeinflusst grundsätzlich die Zellwege und führt wahlweise zu mindestens einer phänotypischen Veränderung im Vergleich zu einer nicht behandelten Zelle. Es ist vorgesehen, dass das erfindungsgemäße Verfahren die mindestens eine phänotypische Veränderung nachweist. Es wird außerdem erwartet, dass kranke Gewebe oder Zellen phänotypische Unterschiede im Vergleich zu gesunden Geweben oder Zellen aufweisen, die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens nachgewiesen werden können.

[0037] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die Klone transformierte Bakterien, rekombinante Phagen, transformierte Säugetier-, Insekten-, Pilz-, Hefe- oder Pflanzenzellen.

[0038] Transformierte Bakterien sind vorzugsweise transformierte E. coli-Zellen; rekombinante Phagen stammen vorzugsweise von M13- oder fd-Phagen; transformierte oder transfizierte Säugetierzellen können Hela- oder COS-Zellen sein. Bei den Insektenzellen werden Spodoptera frugiperda- oder Drosophila melanogaster-Zellen bevorzugt. Bevorzugte Pilzzellen umfassen Aspergillus-Zellen, während Hefezellen vorzugsweise von Pichia pastoris oder Saccharomyces cerevisiae stammen. Es ist anzumerken, dass die Begriffe „transformiert" und „transfiziert" erfindungsgemäß austauschbar verwendet werden.

[0039] Handelt es sich bei den transformierten Bakterien um transformierte E. coli-Zellen, werden am bevorzugtesten die in den nachfolgenden Beispielen beschriebenen E. coli-SCS1-Zellen verwendet. In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform werden die E. coli-Zellen mit einer Bibliothek transformiert, die in einen Vektor kloniert ist, der eine induzierbare Expression erlaubt und vorzugsweise auch ein Tag als Teil des Fusionsproteins exprimiert, vorzugsweise in den in den nachfolgenden Beispielen beschriebenen Vektor pQE-30NST. Der Fachmann kennt jedoch die strukturellen und/oder funktionellen Merkmale von E. coli-Zellen und/oder Vektoren, wie sie in den Beispielen beschrieben sind, so dass alle E. coli-Zellen und/oder Vektoren, die im Wesentlichen dieselben strukturellen und/oder funktionellen Merkmale aufweisen, von der vorliegenden Erfindung eingeschlossen werden.

[0040] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren, bei dem die Anordnung in den Schritten (a) bis (c) im Wesentlichen dasselbe Format hat.

[0041] Diese Ausführungsform der Erfindung ist besonders nützlich, da sie die Erzeugung von Kopien von einer Masterplatte sowie den Ergebnisvergleich auf einer 1:1-Skala erlaubt. Andererseits und weniger bevorzugt kann die Anordnung in mindestens zwei der Schritte (a) bis (c) ein anderes Format haben, z.B. eine andere Skala, solange die eindeutige Verbindung der Klone auf den verschiedenen Kopien noch möglich ist.

[0042] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Anordnung eine Gitterform.

[0043] Das Gitter sollte gemäß der obigen Diskussion vorzugsweise eine hochdichte Anordnung von Klonen der Expressionsbibliothek erlauben. Es sollte außerdem vorzugsweise das Format der in Lehrach, loc. cit. beschriebenen Gitter haben.

[0044] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens hat das Gitter die Abmessungen einer Mikrotiterplatte, eines Silikawafers, eines Chips, eines massenspektrometrischen Targets oder einer Matrix.

[0045] Bei Verwendung dieser Abmessungen kann bei dem erfindungsgemäßen Verfahren herkömmliches

Labormaterial eingesetzt werden. Außerdem erlauben diese Abmessungen die zweckmäßige Analyse einer großen Anzahl von Klonen auf Geräten im Labormaßstab.

[0046] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die Klone an einem festen Träger fixiert.

[0047] Der feste Träger kann biegsam oder nicht biegsam sein. Diese Ausführungsform erlaubt insbesondere die zweckmäßige Lagerung und den Transport der angeordneten Klone der Expressionsbibliothek. Eine besonders bevorzugte Ausführungsform bezieht sich auf gefriergetrocknete Klone, die an dem festen Träger fixiert sind.

[0048] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens bezieht sich auf ein Verfahren, bei dem der feste Träger ein Filter, eine Membran, ein Magnetkügelchen, ein Silikawafer, Glas, Metall, ein Chip, ein massenspektrometrisches Target oder eine Matrix ist.

[0049] Die Filter bzw. Membranen werden besonders bevorzugt aus PVDF oder Nylon hergestellt. Bei den Filtern bzw. Membranen werden DNA oder DNA-haltige Klone besonders bevorzugt auf Nylonmembranfilter (z.B. Hybond N+, Amersham) gespottet/gerastert/gezüchtet, da diese eine hohe DNA-Bindungsfähigkeit haben, und Proteine oder proteinexprimierende Klone auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranfilter (z.B. Hybond PVDF, Amersham), da diese eine hohe Proteinbindungsfähigkeit haben.

[0050] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist mindestens einer der Liganden ein (Poly)peptid, ein Phage, Blut, Serum, ein Toxin, ein Inhibitor, ein Medikament oder ein Medikamentenkandidat, ein nicht-proteinhaltiger oder teilweise proteinhaltiger Rezeptor, ein katalytisches Polymer, ein Enzym, eine Nukleinsäure, eine PNA, ein Virus, eine Zelle, eine anorganische Verbindung, ein Konjugat, ein Farbstoff, ein Gewebe oder ein Konjugat des Liganden.

[0051] Dementsprechend kann der Ligand von verschiedener Natur sein. Wichtig ist, dass die verschiedenen Ligandentypen direkt oder indirekt nachgewiesen werden können und so die Identifizierung der gewünschten Klone ermöglichen.

[0052] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das (Poly)peptid ein Antikörper oder ein $F(ab')_2$-, Fab-, Fv- oder scFv-Fragment, ein Hormon oder ein Enzym oder ein Antikörper, Hormon oder Enzym, das durch Deletion bestimmter Teile modifiziert ist, jedoch im Wesentlichen seine Kapazität, als Ligand zu funktionieren, beibehält.

[0053] Die obigen bevorzugten (Poly)peptide sind besonders vielseitig, leicht zu handhaben und können in großer unterschiedlicher Anzahl bereitgestellt werden.

[0054] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Interaktion in Schritt (b) eine spezifische Interaktion.

[0055] Ein Beispiel für diese Situation ist der Fall, bei dem sich ein Antikörper spezifisch an ein Epitop oder eine (Poly)peptidsequenz bindet, sich z.B. der Antihistidin-Antikörper spezifisch an das 6x-Histidin-Tag, das 5x-Histidin-Tag, das RGS-6x-Histidin-Tag oder ein nur auf einem Protein befindliches Epitop bindet.

[0056] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Interaktion in Schritt (b) eine unspezifische Interaktion.

[0057] Ein Beispiel für diese Situation ist der Fall, bei dem sich ein Antikörper nicht-spezifisch an Epitope bindet, die nicht von identischen DNA-Sequenzen codiert werden, jedoch eine ähnliche dreidimensionale Struktur, Ladung, usw. aufweisen und auf verschiedenen Proteinen vorliegen können. Wie erfindungsgemäß gezeigt werden konnte, kann die Spezifität oder Kreuzreaktivität von Liganden wie z.B. Antikörpern durch Anwendung der vorliegenden Erfindung bestimmt werden. Der Nachweis von Antikörperkreuzreaktivitäten auf Proteinmikroarrays ist nicht überraschend, da Antikörper für gewöhnlich nicht gegen ganze Proteinbibliotheken getestet werden. Das erfindungsgemäße Verfahren zum Screening von Antikörpern gegen Anordnungen potentieller Antigene zum Nachweis gemeinsamer Epitope kann für Reagenzien, die für immunhistochemische oder physiologische Studien über ganze Zellen oder Gewebe verwendet werden sollen, wo sie Reihen unterschiedlicher Strukturen gegenüber stehen, besonders wichtig sein. Alternativ oder zusätzlich können Antikörper ohne bekannte Antigenspezifität (z.B. Lymphomproteine) bezüglich der Bindung an ein sehr verschiedenartiges Re-

pertoire von Proteinmolekülen durchsucht werden. Da all diese Proteine von isolierten Klonen angeordneter cDNA-Bibliotheken exprimiert werden, können die entsprechenden Inserts leicht sequenziert werden, um antigen-codierende Gene zu identifizieren. Erfindungsgemäß ist die Anwendung des Verfahrens zur Charakterisierung der Bindung und/oder Nicht-Spezifität von Antikörpern, Serum, usw. für Homologiestudien über Proteinfamilien und/oder zur Definition von Bindungsdomänen und Epitopen vorgesehen. Weiterhin ist die Technik nicht auf das Antigen/Antikörper-Screening beschränkt, sondern kann auch auf ein Ligand/Rezeptor-System angewandt werden.

[0058] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Hybridisierung in Schritt (c) unter stringenten Bedingungen. Alternativ erfolgt die Hybridisierung in Schritt (c) bevorzugt unter nichtstringenten Bedingungen.

[0059] Bezüglich der Bedeutung und Anwendung der stringenten/nichtstringenten Hybridisierungen gilt im Wesentlichen dasselbe wie das, was in Verbindung mit der Diskussion der spezifischen/unspezifischen Interaktionen aufgeführt wurde.

[0060] In einer besonders bevorzugten Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das Tag c-myc, His-Tag, FLAG, alkalische Phosphatase, V5-Tag, T7-Tag oder Strep-Tag, ein Fusionsprotein, vorzugsweise GST, cellulose-bindende Domäne, grünfluoreszierendes Protein, maltose-bindendes Protein oder lacZ. Erfindungsgemäß kann das Fusionsprotein zwei oder mehr Tags umfassen.

[0061] Die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzte Expressionsbibliothek kann aus einer Vielzahl von Quellen erstellt werden. Sie kann z.B. eine Genombibliothek oder eine Antikörperbibliothek sein. Vorzugsweise umfasst die Bibliothek von Klonen eine cDNA-Bibliothek.

[0062] Die Anordnung wird vorzugsweise mit Hilfe einer automatischen Vorrichtung erzeugt.

[0063] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird/werden die Anordnung der Bibliothek und/oder die Kopien durch einen Sortierautomat und/oder einen Tropfenautomat und/oder einen Rasterautomat erzeugt.

[0064] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren, das weiterhin die Sequenzierung des Nukleinsäureinserts des gewünschten Klons umfasst. Die Sequenzierung des Klons liefert in vielen Fällen die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlichen ultimativ gewünschten Informationen. Protokolle zur Sequenzierung von DNA oder RNA sind im Stand der Technik bekannt und z.B. in Sambrook, loc. cit. beschrieben.

[0065] In einer letzten bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst das Verfahren die Identifizierung des von dem Insert des gewünschten Klons codierten (Poly)peptids.

[0066] Die Identifizierung des von dem gewünschten Klon exprimierten (Poly)peptids kann nach einer Vielzahl von Verfahren erfolgen. Solche Verfahren sind unter anderem als biochemische Standardverfahren wie z.B. Affinitätschromatographie, SDS-PAGE, ELISA, RIA, usw. bekannt. Sobald das (Poly)peptid ausreichend charakterisiert worden ist, kann eine entsprechende chemische Komponente für pharmakologische Anwendungszwecke, z.B. Peptidomimetika entwickelt werden.

[0067] Es ist davon auszugehen, dass die eingeführten Inserts und Vektoren das Genprodukt nach Einbau in die Zelle exprimieren und vorzugsweise während der Lebensdauer der Zelle in diesem Status verbleiben. Zelllinien beispielsweise, die das Polynukleotid unter der Steuerung geeigneter Regulationssequenzen stabil exprimieren, können nach dem Fachmann bekannten Verfahren gentechnisch hergestellt werden. Eher als mit Expressionsvektoren, die virale Replikationsstartpunkte enthalten, können Wirtszellen mit dem erfindungsgemäßen Polynukleotid und einem selektierbaren Marker entweder auf ein- und demselben oder separaten Plasmiden transformiert werden. Nach dem Einbau von Fremd-DNA kann man gentechnisch hergestellte Zellen 1–2 Tage lang in einem angereicherten Medium wachsen lassen und sie dann in ein selektives Medium transferieren. Der selektierbare Marker in dem rekombinanten Plasmid verleiht Auswahlresistenz und ermöglicht die Auswahl von Zellen, in deren Chromosomen das Plasmid stabil eingebaut ist und die wachsen, so dass sich Herde bilden, die wiederum kloniert und in Zelllinien verlängert werden können. Solche gentechnisch hergestellten Zelllinien sind auch für Screeningverfahren zum Nachweis von Verbindungen im Zusammenhang mit z.B. B-Zell-/T-Zellinteraktion besonders nützlich.

[0068] Es kann eine Reihe von Auswahlsystemen eingesetzt werden, z.B., jedoch nicht ausschließlich die Thymidinkinase des Herpes simplex-Virus (Wigler, Cell 11 (1977), 223), Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (Szybalska, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 (1962), 2026) und Adeninphosphoribosyltransferase (Lowy, Cell 22 (1980) 817) in tk^--, $hgprt^-$- bzw. $aprt^-$-Zellen. Als Basis für die Auswahl kann die Antimetabolitenresistenz eingesetzt werden: dhfr, das eine Methotrexatresistenz verleiht (Wigler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 3567; O'Hare, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 1527), gpt, das eine Mycophenolsäureresistenz verleiht (Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981) 2072), Neo, das eine Aminoglycosid G-418-Resistenz verleiht (Colberre-Garapin, J. Mol. Biol. 150 (1981), 1), Hygro, das eine Hygromycinresistenz verleiht (Santerre, Gene 30 (1984), 147) oder Puromycin (pat, Puromycin-N-Acetyltransferase). Es wurden zusätzliche selektierbare Gene beschrieben, z.B. trpB, das Zellen die Nutzung von Indol anstelle von Tryptophan erlaubt, hisD, das Zellen die Nutzung von Histinol anstelle von Histidin erlaubt (Hartmann, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 8047) und ODC (Ornithindecarboxylase), das eine Resistenz gegenüber Ornithindecarboxylaseinhibitor, 2-(Difluormethyl)-DL-Ornithin, DFMO verleiht (McConlogue, 1987, in: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Hrsg.).

[0069] Die Erfindung bezieht sich außerdem auf ein Kit, das mindestens zwei Kopien der an einem festen Träger fixierten zuvor genannten Expressionsbibliotheken umfasst, wobei die Klone solcher Expressionsbibliotheken in Gitterform angeordnet sind. Das erfindungsgemäße Kit eignet sich besonders zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Die verschiedenen Typen möglicher und bevorzugter fester Träger wurden zuvor definiert. Vorzugsweise umfasst das erfindungsgemäße Kit weiterhin mindestens einen Liganden gemäß der obigen Definition.

[0070] Die Komponenten des erfindungsgemäßen Kits können in Behältern wie z.B. Fläschchen, wahlweise in Puffern und/oder Lösungen verpackt werden. Ggf. können eine oder mehrere Komponenten in ein- und denselben Behälter verpackt werden.

[0071] Die Figuren zeigen Folgendes:

Fig. 1

[0072] RGS-His-Nachweis von Proteinexpressionsklonen mit dem RGS-His-Antikörper auf einem Hochdichtefilter. Ein Filter mit 27.648 doppelt angeordneten Klonen wurde mit dem RGS-His-Antikörper durchsucht, um Klone nachzuweisen, die rekombinante Proteine mit His6-Tag exprimieren.

Fig. 2

[0073] Identifizierung von GAPDH-Expressionsklonen. (a) Durchsuchen eines DNA-Filters mit 27.648 doppelt angeordneten cDNA-Klonen mit einer GAPDH-spezifischen DNA-Sonde. (b) Durchsuchen eines identischen Proteinfilters mit denselben Klonen wie in (a) mit einem Anti-GAPDH-Antikörper. Es sind entsprechende Filterabschnitte dargestellt.

Fig. 3

[0074] Venn-Diagramme, die die mittels verschiedener Sonden und Antikörper identifizierten Klonkategorien darstellen. Die Kreise stellen durch Einzelsonden identifizierte Klonsets dar. Klone in Schnittmengen wurden mit Mehrfachsonden nachgewiesen.

Fig. 4

[0075] Sequenzalignment von Sequenzen von GAPDH (a)- und HSP90a (b)-Klonen. Die offenen Leserahmen von GAPDH und HSP90a sind als offene Kästchen dargestellt. Die Linien bezeichnen jeweils die Länge der in dem jeweiligen Klon erwarteten Sequenz, wobei die dickeren Abschnitte das tatsächlich sequenzierte und mit der mRNA-Sequenz voller Länge abgeglichene Fragment darstellen. Die Buchstaben A-E beziehen sich auf die Kategorien von **Fig. 3**.

Fig. 5

[0076] Proteinprodukte von mittels RGS-His- und/oder spezifischen Antikörpern gegen GAPDH (a) oder HSP90a (b) nachgewiesenen Klonen. Die Schattierungen und Ziffern in den Kästchen im oberen Teil bezeichnen die Signalintensitäten auf Hochdichtefiltern. Ganze Zellproteine wurden mit Coomassie-Blau gefärbt. Die

Klonkategorien waren dieselben wie in Fig. 3.

Fig. 6

[0077] Übertragsstempel für den Proteinlösungstransfer von Mikrotiterplatten mit 384 Vertiefungen auf PVDF-Membranen. 16 einzelne, gefederte Nadeln aus rostfreiem Stahl sind auf einem POM-Corpus angebracht (POM = Polyoxymethylen, Polyformaldehyd, Polyacetal). Der Abstand zwischen den Nadeln beträgt 4,5 mm. Die Größe der Spitze am stumpfen Ende beträgt laut Messung 250 µm.

Fig. 7

[0078] Empfindlichkeit des spezifischen Proteinnachweises auf Mikroarrays. In zwei identischen Duplikatreihen wurden äquimolare Konzentrationen (100 pmol/µl – 1 fmol/µl) von gereinigtem menschlichem GAPDH (Duplikate 19–24 und 43–48), menschlichem bHSP90alpha (Duplikate 7–12 und 31–36) und Ratten-bBIP (Duplikate 13–18 und 37–42) (5 × 5 nl) gespottet und mittels eines monoklonalen Anti-GAPDH-Antikörpers nachgewiesen. A: Spotanordnung auf PVDF-Filtermembran (1,9 × 1,9 cm mit 128 Proben, 4 × 4 vertikales Duplikat-Spotting-Muster, schwarze Duplikat-Guide-Spots, Anzahl der Duplikate wie angegeben); B: Relative Intensitäten der Duplikatmittel von A (Guide-Spots ausgeschlossen) mit Nummerierung der Duplikate (wie in A), Name und Menge des gespotteten Proteins und Nachweisschwelle.

Fig. 8

[0079] Hochdurchsatzexpression von Fusionsproteinen mit RGS-His_6-Tag von Klonen der angeordneten hEx1-Bibliothek, nachgewiesen auf einem Mikroarray mittels des monoklonalen Antikörpers RGS-His (Qiagen). Rohe, filtrierte Lysate von 92 Klonen wurden von einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen inklusive 4 Vertiefungen mit Kontrollproteinen (H1, Vektor pQE-30NST ohne Insert; H2, bHSP90alpha, Klon N15170, Vektor pQE-BH6; H3, GAPDH, Klon D215, Vektor pQE-30NST; H4, bBIP, Vektor pQE-BH6) gespottet. A: Reproduzierbarkeit des Nachweises als Diagonale der relativen Duplikatintensitäten; Insert: Spotanordnung auf PVDF-Filtermembran (wie in **Fig.** 7, untere Guide-Spots zur Orientierung verdoppelt); B: Diagramm wie in **Fig.** 7 mit Angabe von (+)- oder (–)-Leserahmen der Inserts, soweit bekannt (Spezifitätsschwelle willkürlich auf eine relative Intensität von 7500 eingestellt).

Fig. 9

[0080] Spezifitätstest von drei monoklonalen Antikörpern auf identischen Mikroarrays von Klonen der angeordneten hEX1-Bibliothek wie in **Fig.** 8 exprimierter Fusionsproteine mit RGS-His_6-Tag. A: Monoklonales Anti-GAPDH (H3, GAPDH, Klon D215, Vektor pQE-30NST); B: Monoklonales Anti-HSP90alpha (H2, bHSP90alpha, Klon N15170, Vektor pQE-BH6; H10, 60S ribosomales Protein L18A; H3, GAPDH, Klon D215, Vektor pQE-30NST); C:
Monoklonales Anti-Alphatubulin (F9 und A4, RF(+)-Alphatubulinklone; C7, RF(–)-Alphatubulinklon; B1 und B12, unbekannte Gene; H3, GAPDH, Klon D215, Vektor pQE-30NST; G1, RF(–)-Betatubulinklon; E5, RPL3 ribosomales Protein L3; H10, RPL18A ribosomales Protein L18A; E6 und D8, RPS2 ribosomales Protein S2; F7, RPS3A ribosomales Protein S3A; E3, RPS25 ribosomales Protein S25); Spezifitätsschwelle willkürlich auf eine relative Intensität von 25.000 eingestellt).

Tabellenlegenden:

Tabelle 1

[0081] Bewertung verschiedener Screeningoptionen für die hEx1-cDNA-Expressionsbibliothek. Die Klonkategorien entsprechen denen von Fig. 3. Die in Klammern gesetzten Ziffern stellen zweite Screenings dar.

Tabelle 2

[0082] Bewertung verschiedener Screeningoptionen für die hEx1-cDNA-Expressionsbibliothek. Die Klonkategorien entsprechen denen von Fig. 2. Die in Klammern gesetzten Ziffern stellen zweite Screenings dar.

Beispiel 1: Erstellung einer angeordneten Expressionsbibliothek menschlicher cDNA

[0083] Es wurde eine Bibliothek von direktional klonierter cDNA von menschlichem fötalem Gehirn (hEx1) in

pQE-30NST, einem Vektor für die IPTG-induzierbare Expression von Fusionsproteinen mit His6-Tag erstellt. pQE30-NST wurde aus pQE-30 (Qiagen), einem pBR322-basierten Expressionsvektor, der einen Phagen-T5-Promotor und zwei lac-Operatoren für die nachfolgende Expression von IPTG-induzierbarem, rekombinantem Protein trägt, hergestellt. Im ersten Schritt wurde pQE-30N durch Einfügen eines synthetischen Oligonukleotids mit einer BgIII- und einer NotI-Schnittstelle in die einmalige PstI-Schnittstelle von pQE-30 erzeugt. In nachfolgenden Schritten wurde ein einen SP6-Promotor tragendes SP6-Promotor-Oligonukleotid zwischen die BamHI- und die SalI-Schnittstelle von pQE-30N eingefügt und anschließend ein zweites, einen T7-Promotor tragendes Oligonukleotid zwischen die HindIII- und die NotI-Schnittstelle. Der entstandene Vektor pQE-30NST kann zum Klonen von cDNA mit SalI- und NotI-Overhangs verwendet werden. Das Insert kann in vitro mittels SP6-RNA-Polymerase im Uhrzeigersinn und mittels T7-RNA-Polymerase gegen den Uhrzeigersinn transkribiert werden.

[0084] Durch PCR-Analyse von 14 Klonen wurde eine mittlere Insert-Größe von etwa 1,4 kb erhalten.

[0085] Als Wirtsstamm für die Erstellung dieser Expressionsbibliothek wurde pSE111 tragendes E. coli-SCS (Stratagene) verwendet. pSE111 wurde aus pSBETc hergestellt (Schenk et al., BioTechniques 19(2) (1995), 196–198).

[0086] pSBETc ist ein pACYC177-basierter Expressionsvektor, der das argU-Gen, ein Kanamycinresistenzgen und eine T7-RNA-Polymerasepromotorschnittstelle für die rekombinante Proteinexpression trägt (Schenk et al., BioTechniques 19 (1995), 196 ff.). Das Helferplasmid pSE111 trägt das lac-Repressor-Gen und das argU (dnaY)-Gen, das eine seltene tRNA codiert, die AGA- und AGG-Arginin-Kodone erkennt (Brinkmann et al., Gene 85 (1989), 109–114), und wurde in zwei Schritten aus pSBETc hergestellt.

[0087] Zur Entfernung der T7-Promotor-Region wurde ein XmnI-EcoRV-Fragment an der Nukleotidposition 2041–2521 aus pSBETc ausgeschnitten.

[0088] Aus dem Plasmid pVH1 wurde ein 1,2 kb schweres, das lacIQ-Gen enthaltendes Fragment ausgeschnitten (Haring et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985), 6090–6094) und in die einmalige EcoRI-Schnittstelle des in Schritt (i) entstandenen Plasmids eingefügt. Man erhielt Plasmide von 5,1 kb mit lacIQ-Inserts in beiden möglichen Ausrichtungen; die lin pSE111-Transkription des lacIQ-Gens erfolgte im Uhrzeigersinn in der veröffentlichten pSBETc-Karte (Schenk et al., BioTechniques 19 (1995), 196 ff.). Dieses Plasmid lag in dem als Wirtsstamm für die cDNA-Expressionsbibliothek verwendeten E. coli-Stamm SCS1 (Stratagene) vor.

[0089] Mittels eines Sortier-/Rasterautomaten wurden 80.640 Klone in Mikrotiterplatten mit 384 Vertiefungen sortiert und bei hoher Dichte auf Nylon- und Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Filter gerastert. Nylonfilter wurden für DNA-Hybridisierungen behandelt (DNA-Filter), wohingegen PVDF-Filter zur Auslösung der Proteinexpression auf IPTG enthaltende Agarplatten transferiert und für den Proteinnachweise behandelt wurden (Proteinfilter).

Beispiel 2: Proteinexpressionsscreening auf Hochdichtefiltern

[0090] Hochdichte Proteinfilter der hEx1-Bibliothek wurden mit dem monoklonalen RGS-His-Antikörper durchsucht, der die N-terminale Sequenz RGSH6 von dem pQE-30NST-Vektor überexprimierter rekombinanter Fusionsproteine erkennt (Fig. 1). Etwa 20% der Klone waren positiv (Signale der Intensität 1, 2 oder 3, Klassifikation 1 bis 3). Diese Klone galten als mutmaßliche Proteinexpressionsklone (Fig. 1). Die hEx1-cDNA-Bibliothek wurde durch Oligo (dT)-Priming mittels eines Kit von Life Technologies (Superscript Plasmid System) aus menschlichen fötalen Hirngeweben hergestellt (Gubler et al., Gene 25 (1983), 263). Die cDNA wurde mittels Gelfiltration nach Größe fraktioniert und die einzelnen Fraktionen wurden zwischen der SalI- und der NotI-Schnittstelle des Expressionsvektors pQE-30NST ligiert. Als Wirtsstamm wurde das Helferplasmid pSE111 tragendes E. coli-SCS1 (Stratagene) verwendet. Nach der Transformation durch Elektroporation wurde die Bibliothek auf quadratische Agarplatten (Nunc Bio Assay Dish) aufgetragen und bei 37° C über Nacht wachsen gelassen. Mittels eines automatischen Robotersystems (Lehrach et al., Interdisciplinary Science Reviews 22 (1997), 37–44) wurden Kolonien in Mikrotiterplatten mit 384 Vertiefungen (Genetix) sortiert, die mit 100 µg/ml Ampicillin, 15 µg/ml Kanamycin, 2% Glucose und Gefriermischung (0,4 mM $MgSO_4$, 1,5 mM Na_3-Citrat, 6, 8 mM $(NH_4)_2SO_4$, 3, 6% Glycerin, 13 mM KH_2PO_4, 27 mM K_2HPO_4, pH 7,0) enthaltendem 2xYT-Medium gefüllt waren. In den Mikrotiter-Vertiefungen wurden bei 37° C über Nacht Bakterien gezüchtet und mit Hilfe von Replikationswerkzeugen mit 384 Nadeln (Genetix) in neue Mikrotiterplatten repliziert. Alle Kopien wurden bei 80° C gefriergelagert.

Beispiel 3: Identifizierung von Genen und Proteinen auf entsprechenden Filtersets

[0091] Als Beispielproteine wurden GAPDH und HSP90a gewählt, mit offenen Leserahmen von 1008 bp und 35.922 Dalton bei GAPDH (Swiss-Prot P04406) bzw. 2199 by und 84.542 Dalton bei HSP90a (Swiss-Prot P07900).

[0092] Ein Set mit drei DNA-Hochdichtefiltern (80.640 Klone) der hEx1-Bibliothek wurde mit genspezifischen cDNA-Sonden durchsucht. Wie beschrieben, wurden mittels Roboter-Spotting Hochdichtefilter hergestellt (Maier et al., Drug Discovery Today 2 (1994), 315–324; Lehrach et al., Interdisciplinary Science Reviews 22 (1997), 37–44). Die Bakterienkolonien wurden zur DNA-Analyse auf Nylonmembranfilter (Hybond N+, Amersham) und zur Proteinanalyse auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranfilter (Filterformat 222 mm × 222 mm) (Hybond-PVDF, Amersham) gerastert. Die Klone wurden bei einer Dichte von 27.648 Klonen pro Filter in einem Duplikatmuster um Tinten-Guide-Punkte herum gespottet. Hochdichtefilter wurden auf quadratische, 100 µg/ml Ampicillin, 15 µg/ml Kanamycin und 2% Glucose enthaltende 2xYT-Agarplatten (Nunc Bio Assay Dish) gelegt.

[0093] Die für die DNA-Analyse zu verwendenden Filter wurden über Nacht bei 37° C wachsen gelassen und anschließend wie zuvor beschrieben behandelt (Hoheisel et al., J. Mol. Bio. 220 (1991), 903–914). Die Filter für die Proteinanalyse wurden über Nacht bei 30° C wachsen gelassen und anschließend zur Auslösung der Proteinexpression, ausgelöst über 3 Stunden bei 37° C, auf mit 1 mM IPTG ergänzte Agarplatten transferiert. Die exprimierten Proteine wurden auf den Filtern fixiert, indem die Filter auf Fließpapier gelegt wurden, das 10 Minuten lang in 0, 5 M NaOH, 1, 5 M NaCl, zweimal 5 Minuten lang in 1 M Tris-HCl, pH 7,5, 5 Minuten lang in 1,5 M NaCl und schließlich 15 Minuten lang in 2 × SSC eingeweicht wurde. Die Filter wurden an der Luft getrocknet und bei Raumtemperatur gelagert.

[0094] Wie beschrieben, erfolgten DNA-Hybridisierungen mittels digoxigenin-markierter PCR-Sonden und alkalischem Phosphatase-Substrat Attophos (JBL Scientific, San Luis Obispo) (Maier et al., J. Biotechnol. 35 (1994), 191–203). Die digoxigeninmarkierten Hybridisierungssonden wurden mittels PCR-Amplifikation eines den kompletten offenen Leserahmen des menschlichen GAPDH enthaltenden Klons und des einen C-terminalen Teil von H5P90a enthaltenden IMAGE-Klons Nr. 343722 hergestellt (GenBank W69361).

[0095] Bei einer menschlichen GAPDH-Sonde (**Fig.** 2a) waren 206 (0,26) Klone positiv (Tabelle 1) (**Fig.** 2a). Eine zweite Hybridisierung bestätigte 202 und wies 35 weitere Klone nach (Gesamtzahl damit 237, Tabelle 1). 56 (0,07) Klone wurden mit einer menschlichen HSP90a-Sonde identifiziert. Auf den entsprechenden Proteinfiltern wurden mittels RGS-His-Antikörper 56 (27%) bzw. 14 (25%) GAPDH- bzw. HSP90a-positive Klone erkannt.

[0096] Das Antikörperscreening auf Hochdichtefiltern wurde wie folgt durchgeführt: Ein Kaninchen-Anti-GAPDH-Serum wurde wie beschrieben affinitätsgereinigt (Gu et al., BioTechniques 17 (1994), 257–262). Anti-HSP90 (Transduction Laboratories, Lexington) richtet sich gegen die Aminosäuren 586 bis 732 von HSP90a. Trockene Proteinfilter wurden in Ethanol eingeweicht und Bakterientrümmer wurden mit Papierhandtüchern in TBST-T (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5 M NaCl, 0,05% Tween 20, 0,5% Triton X–100) abgewischt. Die Filter wurden 1 Stunde lang in Blockierpuffer (3% fettloses Trockenmilchpulver in TBS, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5) blockiert und über Nacht mit 50 ng/ml Anti-HSP90-Antikörper oder Anti-GAPDH-Antikörper (Verdünnung 1:5000) inkubiert. Nach zweimaligem 10-minütigem Waschen in TBST-T und einmaligem Waschen in TBS wurden die Filter 1 Stunde lang mit sekundärem Antikörper, konjugiert mit alkalischer Phosphatase (AP), inkubiert. Nach dreimaligem 10-minütigem Waschen in TBST-T, einmaligem Waschen in TBS und einmaligem Waschen in AP-Puffer (1 mM $MgCl_2$, 0,1 M Tris-HCl, pH 9,5) wurden die Filter 10 Minuten lang in 0,5 mM Attophos (JBL Scientific, San Luis Obispo) in AP-Puffer inkubiert. Die Filter wurden mit langwelligem UV-Licht beleuchtet; für die Bilderzeugung wurde ein hochauflösendes CCD-Detektionssystem verwendet (Maier et al., Drug Discovery Today 2 (1997), 315–324). Die positiven Klone wurden mittels einer anwenderspezifischen Bildanalysesoftware gezählt. Bei einem polyklonalen Anti-GAPDH-Antikörper (**Fig.** 2b) waren 39 Klone positiv (Tabelle 2). Diese wurden alle mittels des RGS-His-Antikörpers nachgewiesen, doch bei der GAPDH-spezifischen DNA-Sonde wurden nur 32 positive Klone gezählt. 5 der 7 nicht erfassten Klone wurden jedoch in der zweiten DNA-Hybridisierung nachgewiesen. Das Screening mit einem monoklonalen Anti-HSP90-Antikörper lieferte 32 positive Klone, von denen 28 durch die HSP90a-DNA-Sonde nachgewiesen wurden; 10 waren sowohl bei der HSP90a-DNA-Sonde als auch bei dem RGS-His-Antikörper positiv. In einem zweiten Anti-HSP90-Screening wurden 30 Klone bestätigt und 12 neue Klone nachgewiesen, die alle bei der HSP90a-DNA-Sonde positiv waren.

Beispiel 4: Sequenz- und Western Blotting-Analyse der nachgewiesenen Klone

[0097] Fig. 3 fasst die für GAPDH und HSP90a erhaltenen Filterdaten zusammen. Klone der Kategorien A-E wurden durch Sequenzierung der 5'-Enden ihrer cDNA-Inserts (**Fig.** 4) und durch Western Blotting (**Fig.** 5) analysiert. Die folgenden experimentellen Protokolle wurden durchgeführt.

(A) Positive Klone – insgesamt

[0098] 10 mittels der DNA-Sonde identifizierte GAPDH-Klone; das Anti-GAPDH und der RGS-His-Antikörper wurden sequenziert und enthielten GAPDH-Sequenzen im richtigen Leserahmen. 9 Klone exprimierten die gesamte GAPDH-Sequenz und die 5'-UTR umfassende rekombinante Proteine mit His6-Tag, und Vektoraminosäuren codierten Aminosäuren durch die 5'-UTR der mRNA und des Vektors.

[0099] Alle 10 positiven Klone bei der HSP90a-DNA-Sonde, dem RGS-His und dem Anti-HSP90-Antikörper hatten HSP90a-Sequenzen im richtigen Leserahmen. Keiner davon umfasste jedoch die gesamte Codierregion, und 5 Klone exprimierten nachweislich Fusionsproteine mit His6-Tag, die von unterschiedlich großen C-terminalen Teilen der HSP90a-Sequenz translatiert worden waren.

(B) Negative Klone – spezifischer Antikörper

[0100] Es wurde gezeigt, dass sich die Sequenzen von 7 bei dem spezifischen GAPDH-Antikörper negativen GAPDH-Klonen auf Filtern mit der GAPDH-GenBank-Sequenz überschneiden. 2 dieser Klone besaßen Inserts im richtigen Leserahmen und exprimierten GAPDH-Fragmente (24 kD), die beim Western Blotting durch den Anti-GAPDH-Antikörper gefärbt wurden (Fig. 5a, B, Bahnen 11, 12). Bei den anderen 5 Klonen waren die GAPDH-Inserts in falschen Leserahmen, was darauf deutet, dass bei ihrer Expression wahrscheinlich Peptide im Bereich von 6,5 bis 16,7 kD Polypeptiden exprimiert wurden (Fig. 5a, B, Bahnen 13–17). Die Signalintensitäten dieser Klone waren im Allgemeinen bei Sondierung mit dem RGS-His-Antikörper auf Hochdichtefiltern gering. 3 von 4 HSP90a-Klonen besaßen Inserts in einem falschen Leserahmen und exprimierten kurze Peptide, die nicht mit dem Anti-HSP90-Antikörper reagierten (2 Klone dargestellt in Fig. 5b, Bahnen 6, 8). Der verbleibende Klon mit einem Insert im richtigen Leserahmen ergab beim Western Blotting eine Bande der berechneten Größe (56, 0 kD) und wurde in einem zweiten Screening des Hochdichtefilters durch den Anti-HSP90-Antikörper nachgewiesen.

(C) Positive Klone – nur DNA-Sonde

[0101] 11 von 12 zufällig ausgewählten GAPDH-Klonen enthielten erwiesenermaßen ein GAPDH-Insert in einem falschen Leserahmen und exprimierten vermutlich Peptide im Bereich von 3,4 bis 9,1 kD. Der Klon MPMGp800A1755 besaß ein Insert im richtigen Leserahmen, trug jedoch eine Punktmutation in Position –8 in der 5'-UTR, was zu einem Stop-Kodon und einem Peptid einer berechneten Größe von 4,7 kD führte. Die DNA-Sequenzanalyse deutete darauf hin, dass 11 von 12 HSP90a-Klonen Inserts in einem falschen Leserahmen enthielten und möglicherweise Peptide einer berechneten Molekülmasse von 2,8 bis 5,4 kD exprimierten. Nur der Klon MPMGp800113115 besaß ein Insert im richtigen Leserahmen, exprimierte ein Protein einer Größe von 78,7 kD und war in einem zweiten Screening mit Anti-HSP90-Antikörper positiv.

[0102] Bei der GAPDH- bzw. HSP90a-DNA-Sonde wurden keine falschpositiven Klone gefunden.

(D) Negative Klone – DNA-Sonde

[0103] Es wurde gezeigt, dass 4 GAPDH-Klone richtige Inserts hatten und falsch-negative Klone der DNA-Sonde darstellten, jedoch in einem zweiten DNA-Hybridisierungsexperiment nachgewiesen wurden. 2 Klone enthielten Sequenzen von menschlichem Polyubiquitin (GenBank D63791) und menschlichem HZF10 (PIR S47072).

[0104] Alle 4 HSP90a-Klone exprimierten Polypeptide, die beim Western Blotting nachgewiesen wurden (Fig. 5b, D). Der Klon MPMGp800G06207 (Bahn 12) enthielt ein HSP90a-Insert mit einer 46 bp-Deletion und war offensichtlich ein falsch-negatives Klon der HSP90a-DNA-Sonde. Die verbleibenden 3 Klone besaßen Inserts mit einer Sequenzhomologie zu uterusspezifischem, prolinreichem Säureprotein von Mäusen (GenBank U28486; Bahnen 9, 10) bzw. waren mit einer EST-Sequenz unbekannter Funktion identisch (Bahn 11).

(E) Positive Klone – DNA-Sonde und spezifischer Antikörper (RGS-His)

[0105] 10 von der HSP90a-DNA-Sonde und dem Anti-HSP90-Antikörper, nicht aber dem RGS-His-Antikörper erkannte Klone wurden sequenziert und enthielten HSP90a-Sequenzen in einem falschen Leserahmen. Von diesen Klonen exprimierte Polypeptide mit His6-Tag hätten berechnete Massen von 3,2 bis 6,1 kD und würden im Western Blotting nicht gefunden (Fig. 5b, E). Im Gegensatz dazu wurden passende Bandenmuster beim Anti-HSP90-Antikörper beobachtet.

[0106] cDNA-Klone enthaltende Bakterien wurden durch Schütteln in 2 ml 100 μg/ml Ampicillin, 15 μg/ml Kanamycin und 2% Glucose enthaltendem 2xYT-Medium gezüchtet. Bei einer OD_{600} von 0,4 wurde der 1 mM Endkonzentration IPTG zugesetzt und die Inkubation über 3 Stunden bei 37° C fortgesetzt. Gemäß Laemmli wurden Ganzzellproteinextrakte einer 15% SDS-PAGE unterzogen und mit Coomassie-Blau gefärbt (Laemmli, Nature 227 (1970), 680–685).

[0107] Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine mittels einer halbtrockenen Elektrotransfervorrichtung (Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers auf PVDF-Membranen (Immobilon P, Millipore) in 20 mM Tris, 150 mM Glycin, 0,1% SDS, 10% Methanol transferiert.

[0108] Die cDNA-Inserts wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer pQE65 (TGA GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG) und pQE276 (GGC AAC CGA GCG TTC TGA AC) bei einer Glühtemperatur von 65° C amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mittels Dye-Terminator-Zyklus-Sequenzierung mit dem Primer pQE65 und ABI-Sequenzanalysatoren (Perkin Elmer) von der Serviceabteilung unseres Institutes sequenziert.

Beispiel 5: Vektorkonstrukte

[0109] pQE-30NST (GenBank-Zugriffsnummer AF074376) wurde beschrieben (Büssow et al., Nucleic Acids Res. 26 (1998), 5007–5008). pQE-BH6 wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Einfügen eines die Proteinsequenz LNDIFEAQKIEW codierenden Oligonukleotids zwischen MRGS und His_6 von pQE-30 (Qiagen) und zur Trennung der beiden Teile des RGS-His_6-Epitops hergestellt.

Beispiel 6: Antikörper

[0110] Es wurden monoklonale Antikörper der folgenden Hersteller in den angegebenen Verdünnungen verwendet: Mäuse-Anti-RSG-His (QIAGEN, 1:2000), Mäuse-Anti-Kaninchen-GAPDH (Research Diagnostics, Inc., Klon 6C5, 1:5000), Mäuse-Anti-HSP90 (Transduction Laboratories, Klon 68, 1:2000), Ratten-Anti-Alpha-tubulin (Serotec Ltd., Klon YL1/2, 1:2000).

[0111] Sekundäre Antikörper waren $F(ab')_2$-Kaninchen-Anti-Mäuse-IgG-HRP (Sigma) und $F(ab')_2$-Kaninchen-Anti-Ratten-IgG-HRP (Serotec Ltd.) (Verdünnung 1:5000) zum Nachweis monoklonaler Mäuse- bzw. Rattenantikörper.

Beispiel 7: Proteinexpression und -reinigung im großtechnischen Maßstab

[0112] Die Proteine wurden in E. coli-Flüssigkulturen (Stamm SCS1) exprimiert. 900 ml 100 μg/ml Ampicillin und 15 μg/ml Kanamycin enthaltendes SB-Medium (12 g/l Bactotrypton, 24 g/l Hefeextrakt, 17 mM KH_2PO_9, 72 mM K_2HPO_4, 0, 4% (v/v) Glycerin) wurden mit 10 ml einer Übernacht-Kultur geimpft und bei 37° C geschüttelt, bis eine OD_{600} von 0,8 erreicht war. Einer Endkonzentration von 1 mM wurde Isopropyl-b-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) zugesetzt. Die Kultur wurde 3,5 Stunden lang bei 37° C geschüttelt und mit Eis auf 4° C abgekühlt. Die Zellen wurden mittels 10-minütigem Zentrifugieren mit 2100 g geerntet, in 100 ml Phosphatpuffer (50 mM NaH_2PO_4, 0,4 M NaCl, pH 8,0) erneut suspendiert und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in 3 ml pro Gramm Nassgewicht des Lysepuffers (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0), der 0,25 mg/ml Lysozym enthielt, 30 Minuten lang auf Eis lysiert. Die DNA wurde mit einem Ultraschallhomogenisator (Sonifier 250, Branson Ultrasonics, Danbury, USA) 3 × 1 Minute lang mit 50% Kraft auf Eis scherzerkleinert. Das Lysat wurde mittels 30-minütigem Zentrifugieren mit 10.000 g gereinigt. Ni-NTA-Agarose (Qiagen) wurde zugesetzt und mittels 1-stündigem Schütteln bei 4° C gemischt. Das Gemisch wurde in eine Säule gegossen, die anschließend mit 10 Bettvolumina 20 mM Imidazol enthaltendem Lysepuffer gewaschen wurde. Das Protein wurde in 250 mM Imidazol enthaltendem Lysepuffer eluiert und bei 4° C über Nacht gegen TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4) dialysiert.

Beispiel 8: Hochdurchsatzproteinexpression im Labormaßstab

[0113] Die Proteine wurden von ausgewählten Klonen der angeordneten Expressionsbibliothek menschlicher fötaler Gehirn-cDNA (hEx1) exprimiert (Büssow et al., Nucleic Acids Res. 26 (1998), 5007–5008). Diese Bibliothek wurde zur IPTG-induzierbaren Expression der Fusionsproteine mit His_6-Tag direktional in pQE-30NST kloniert. Mikrotiterplatten mit 96 2 ml fassenden Vertiefungen (StoreBlock, Zinsser) wurden mit 100 µl durch 100 µg/ml Ampicillin und 15 µg/ml Kanamycin ergänztem SB-Medium gefüllt. Die Kulturen wurden mit E. coli-SCS1-Zellen von Bibliotheksplatten mit 384 Vertiefungen (Genetix, Christchurch, UK) geimpft, die bei –80° C gelagert worden waren. Zum Impfen wurden Replikationsvorrichtungen mit 96 Stahlnadeln (Länge 6 cm) verwendet. Nach Kultivieren über Nacht bei 37° C unter starkem Schütteln wurden 900 µl des vorgewärmten Mediums den Kulturen zugesetzt und die Inkubation über 1 Stunde fortgesetzt. Zur Auslösung der Proteinexpression wurde einer Endkonzentration von 1 mM IPTG zugesetzt. Sämtliche nachfolgenden Schritte inklusive Zentrifugieren erfolgten ebenfalls im 96-Vertiefungen-Format. Die Zellen wurden mittels 10-minütigem Zentrifugieren mit 1900 g (3400 UpM) geerntet, durch erneute Suspension in Phosphatpuffer gewaschen, 5 Minuten lang zentrifugiert und durch erneute Suspension in 150 µl Puffer A (6 M Guanidinium-HCl, 0,1 M NaH_2PO_9, 0, 01 M Tris-HCl, pH 8, 0) lysiert. Die Bakterientrümmer wurden durch 15-minütiges Zentrifugieren mit 4000 UpM pelletiert. Die Überstände wurde durch eine eine nichtproteinbindende PVDF-Membran einer Porengröße von 0,65 µm (Durapore MADV N 65, Millipore) enthaltende Filterplatte mit 96 Vertiefungen auf einem Vakuumfilterhalter filtriert.

Beispiel 9: Automatisches Filter-Spotting

[0114] Zuvor zugeschnittene (25 × 75 cm) Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Filterstreifen (Immobilon P, Millipore) wurden in 96% Ethanol eingeweicht und 1 Minute lang mit destilliertem Wasser gespült. 5 nasse Filterstreifen wurden mittels Klebeband an einer 230 × 230 mm großen Kunststoffwanne befestigt. Das Spotting erfolgte mit Hilfe eines motorbetriebenen Übertragsstempels (**Fig. 6**), der mit einer Auflösung von 5 µm in x-y-z-Richtung positioniert werden kann (Linear Drives, Basildon, UK). Dies erlaubt eine Dichte von etwa 300 Proben/cm^2, gespottet in einem Duplikatmuster. Der Übertragsstempel besitzt 4 × 4 = 16 einzeln befestigte, gefederte Nadeln im Abstand von 4, 5 mm. Da der Abstand zu dem Abstand der Platten mit 384 Vertiefungen kompatibel ist, ermöglicht diese Vorrichtung das hochdichte Spotting von Miktrotiterplatten mit 384 Vertiefungen. Die Größe der Spitze des stumpfen Endes der Nadeln aus rostfreiem Stahl beträgt 250 µm. Vor dem Transfer wurde die Spotting-Vorrichtung in einem 30% Ethanol-Bad gewaschen und anschließend mit einem Ventilator getrocknet, um eine Kreuzkontaminierung zu verhindern. Für die hier dargestellten Experimente wurden mit jeder Nadel 4 × 4 Muster gespottet. Jedes Muster enthält 3 Tinten-Guide-Spots, die von 6 doppelt gespotteten Proben umgeben sind (12 Probenspots insgesamt, **Fig. 7A**). Jeder Spot wurde fünfmal mit derselben Proteinprobe (jeweils 5 nl) beladen. Nach Anpassung der Spotting-Höhe im voraus dauerte das Spotting der 96 Proben zur Erzeugung von 5 identischen Proteinmikroarrays etwa 20 Minuten.

Beispiel 10: Antikörpernachweis und Bildanalyse

[0115] Nach dem Spotting wurden die Filter 1 Minute lang in Ethanol eingeweicht, mit destilliertem Wasser gespült, 1 Minute lang in TBST (TBS, 0,1% Tween 20) gewaschen, 60 Minuten lang in 2% Rinderserumalbumin (BSA)/TBST blockiert, 1 Stunde lang bei Raumtemperatur mit monoklonalen Antikörpern in 2% BSA/TBST inkubiert, zweimal 10 Minuten in TBST gewaschen und 1 Stunde lang mit sekundären Antikörpern in 2% BSA/TBST inkubiert. Anschließend wurden die Filter über Nacht in 20 ml TBST gewaschen und 1 bis 10 Minuten lang in 2 ml CN/DAB-Lösung (Pierce) inkubiert; die positiven Reaktionen wurden als schwarze Spots nachgewiesen. Die Bilder wurden mittels einer gekühlten CCD-Kamera (Fuji LHS, Raytest, Deutschland) erhalten. Die Bilder wurden durch ein Fujinon-Objektiv (f: 0,8, 50 mm) mit einer Integrationszeit von 20 ms aufgenommen. Die Bildanalyse erfolgte mit dem AIDA-Paket (Raytest, Deutschland) zur Spoterkennung und -quantifizierung. Die resultierenden Spotwerte wurden auf ein Excel-Spreadsheet (Microsoft, USA) transferiert, um die Diagramme der **Fig.** 7, 8 und 9 darzustellen.

Beispiel 11: Herstellung von Proteinmikroarrays

[0116] Die Proteine wurden in flüssigen Bakterienkulturen exprimiert und die Lösungen wurden entweder als Rohlysate oder nach Reinigung mittels Ni-NTA-immobilisierter Metallaffinitätschromatographie (IMAC) auf PVDF-Filter gespottet (Hochuli et al., J. Chromatography 411 (1987), 177–184). Wegen ihrer überlegenen Proteinbindungsfähigkeit und mechanischen Festigkeit (im Vergleich zu Nitrocellulose) sowie zufriedenstellender früherer Leistung wurden PVDF-Filtermembranen verwendet (Büssow et al., Nucleic Acids Res. 26 (1998), 5007–5008). Der neue Übertragsstempel (**Fig. 6**) besteht aus Nadeln, deren Spitze 250 µm groß ist, was fast

der Hälfte der Größe der 450 µm-Nadeln entspricht, die bislang für die Erzeugung von in situ-Proteinexpressionsfiltern verwendet wurden (Büssow et al., Nucleic Acids Res. 26 (1998), 5007–5008). Zwar zeigen die **Fig.** 7, 8 und 9 als unsere ersten Testergebnisse etwa dieselbe Spotting-Dichte wie unsere in situ-Filter, doch der kleinere Nadelspitzendurchmesser ermöglicht höhere Spotting-Dichten. Während ein in situ-Filter von 222 × 222 mm 27.648 Klone aufnimmt (5 × 5 Duplitat-Spotting-Muster mit einem Guide-Spot), konnten mit dem neuen Übertragsstempel mehr als 100.0000 Proben auf dieselbe Fläche gesetzt werden. Dies ermöglicht eine erhebliche Reduktion der Gesamtanordnungsgröße auf ein zweckmäßigeres Mikroskop-Objektträger-Format (25 × 75 mm mit 4800 Proben, entspricht 2400 Duplikaten). Das miniaturisierte Set-up erlaubt eine sehr ökonomische Verwendung und hohe Reagenzienkonzentrationen in Inkubationslösungen, da ein wesentlich kleineres Puffervolumen ausreicht, um die Filter zu bedecken. Im Gegensatz zu in situ-Filtern sind die erhaltenen Signale auf Mikroarrays scharf und gut lokalisiert. Als nächsten Schritt bei der Herstellung von Proteinchips sehen wir eine weitere Steigerung der Dichte mittels Hochgeschwindigkeits-Picoliter-Spotting (Tintenstrahldrucken) auf modifizierte Glasoberflächen vor. Es wurden alternative Ansätze für Proteinmikroarrays berichtet: Photolithographie von Silanmonoschichten (Mooney et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996), 12287–12291) oder Tintenstrahldrucken auf Polystyrolfilme (Ekins, Clin. Chem. 44 (1998), 2015–2030; Silzel et al., Clin. Chem. 44 (1998), 2036–2043). Im Gegensatz zu unserer Bibliotheks-Spotting-Technologie konzentrieren sich diese Fortschritte auf die Herstellung miniaturisierter Immunoassay-Formate durch musterförmige Anordnung einzelner Proteine (z.B. BSA, Avidin oder monoklonale Anti-IgG-Antikörper).

Beispiel 12: Empfindlichkeit des spezifischen Proteinnachweises

[0117] Die Empfindlichkeit des spezifischen Proteinnachweises auf Mikroarrays wurde durch Spotting verschiedener Konzentrationen dreier gereinigter Proteine – menschlicher Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH, Swiss-Prot P04406), eines C-terminalen Fragments (40,3 kD) eines menschlichen Hitzeschockproteins 90 alpha (HSP90alpha, Swiss-Prot P07900) und des schwere Ketten bindenden Rattenimmunglobulinproteins (BIP, Swiss-Prot P06761) – bewertet. Die Mikroarrays wurden anschließend mit einem monoklonalen Anti-GAPDH-Antikörper, Kaninchen-Anti-Mäuse-IgG-HRP und dem HRP-Substrat CD/DAB inkubiert (**Fig. 7A**). Die Nachweisempfindlichkeit – als niedrigste Konzentration, die klar sichtbare, spezifische Spots über dem Hintergrundrauschen lieferte (Nachweisschwelle) – betrug laut Berechnung 10 fmol/µl, was 250 Attomol bzw. 10 pg GAPDH in 5 × 5 nl (gespottet) entspricht (**Fig. 7B**).

Beispiel 13: Hochdurchsatzscreening auf Proteinexpression

[0118] Rohlysate von 92 Klonen der angeordneten Bibliothek menschlicher fötaler Gehirn-cDNA (hEx1) (Büssow et al., Nucleic Acids Res. 26 (1998), 5007–5008), die zuvor durch den monoklonalen Antikörper RGS-His (Qiagen) auf in situ-Filtern als Proteinexpressoren identifiziert worden waren, wurden an 4 Kontrollproben und Tinten-Guide-Spots entlang doppelt gespottet. Die Mikroarrays wurden mittels desselben Antikörpers auf die Expression von Fusionsproteinen mit RGS-His_6-Tag durchsucht (**Fig. 8A**, Insert). Werden die relativen Intensitäten der Duplikate (siehe **Fig. 7A**) gegeneinander aufgetragen, deutet die entstandene Diagonale auf eine gute Reproduzierbarkeit des Nachweisverfahrens (**Fig. 8A**). Daher wurden die Duplikatmittel bei allen 96 Proben aufgetragen und eine willkürliche Spezifitätsschwelle zur Identifizierung von positiven Klonen auf eine relative Intensität von 7500 eingestellt (**Fig. 8B**). Unter diesen Bedingungen war eine Negativkontrolle (H1, Vektor pQE-30NST ohne Insert) ebenso klar negativ (relative Intensität 1500) wie ein HSP90alpha-Klon mit einem geteilten RGS-His_6-Epitop (H2, Vektor pQE-BH6, relative Intensität 0). Das Lysat eines GAPDH-Klons mit RGS-His_6-Tag (H3, Vektor pQE-30NST) wurde als Positivkontrolle eingesetzt und lieferte ein Signal einer relativen Intensität von 21.000. Das bei einem Ratten-BIP-Klon (H4, Vektor pQE-BH6) erhaltene eindeutig positive Ergebnis (relative Intensität 15.000) ist überraschend, da dieser Klon ebenfalls über ein geteiltes RGS-His_6-Epitop verfügt. Die Reaktivität könnte durch die teilweise Rekonstitution des RGS-His_6-Epitops aufgrund der Konformationseigenschaften von BIP erklärt werden.

[0119] Die cDNA-Inserts von 54 der 92 mutmaßlichen hEx1-Expressionsklone zeigen eine Homologie zu den GenBank-Einträgen menschlicher Gene (Büssow, Doktorarbeit, Chemische Fakultät, Freie Universität Berlin (1998)). Diese Inserts wurden auf ihre Leserahmen (RF) in Relation zu der vektorcodierten RGS-His_6-Tag-Sequenz überprüft. Es stellte sich heraus, dass 34 Inserts (63%) im richtigen Leserahmen (RF+) kloniert waren, 20 (37%) jedoch in einem falschen Leserahmen (RF–), so dass man erwartete, dass diese Klone das vorhergesagte Protein nicht exprimieren konnten. Alle 92 Klone wurden jedoch ursprünglich aufgrund der eindeutig positiven Signale bei dem monoklonalen Antikörper RGS-His als Proteinexpressoren auf in situ-Filtern ausgewählt (Intensitätsebenen 2 und 3) (Büssow, Doktorarbeit, Chemische Fakultät, Freie Universität Berlin (1998)). Auf Mikroarrays wurde die Anzahl der als Proteinexpressoren identifizierten falschen Leserahmen-Klone um 70% reduziert, da nur 6 RF(–)-Klone als positiv bestätigt wurden (**Fig. 8B**). Dies deutet darauf hin, dass die

neue Mikroarray-Technologie aufgrund ihrer überlegenen Fähigkeit zum Ausschluss falscher Leserahmen-Klone einen großen Fortschritt gegenüber in situ-Filtern darstellt. Andererseits war nur ein RF(+)-Klon eindeutig unter der Spezifitätsschwelle und wäre bei diesem Screening wahrscheinlich aufgrund einer unzureichenden in die Mikrotitervertiefung exprimierten Proteinmenge übersehen worden. Auch dies betont die Bedeutung unseres Ansatzes, der ausschließlich auf der „Positiv"-Bestätigung durch Sequenzierung und/oder Proteincharakterisierung beruht (Büssow et al., Nucleic Acids Res. 26 (1998), 5007–5008).

[0120] Zusammengefasst führte das Screening der Hochdurchsatzproteinexpression auf Mikroarrays zu einer Falsch-Negativ-Rate von weniger als 2% (1 nicht nachgewiesener RF(+)-Klon von insgesamt 54 Klonen). Die Rate der falschpositiven Klone, die Proteine in falschen Leserahmen exprimieren, betrug nur 11% im Vergleich zu 37% bei in situ-Filtern (Büssow, Doktorarbeit, Chemische Fakultät, Freie Universität Berlin (1998)). Dies macht Protein-Mikroarrays zu einem ökonomischen Werkzeug für ein sehr empfindliches Proteinexpressionsscreening.

Beispiel 14: Antikörperspezifitätsscreening

[0121] Protein-Mikroarrays mit demselben Testset von 92 hEx1-Expressionsklonen und 4 Kontrollen (siehe oben) wurden mittels monoklonaler Antikörper auf die menschlichen Proteine GAPDH, HSP90alpha und Alphatubulin durchsucht. Während der Anti-GAPDH-Antikörper ausschließlich sein Zielantigen nachwies (H3, Fig. 9A), erkannte Anti-HSP90alpha zwar vorzugsweise sein Zielantigen (H2, Fig. 9B), zeigte jedoch eine gewisse Kreuzreaktivität mit mindestens 2 anderen Klonen (H10, 60S ribosomales Protein L18A und H3, GAPDH). Die Antikörper-Kreuzreaktivität war bei dem Anti-Alphatubulin-Screening sogar noch ausgeprägter (Fig. 9C). Während die beiden RF(+)-Alphatubulin-Klone in dem Testset (F9 und A4) spezifisch erkannt wurden und das einzige RF(–)-Klon (C7) unentdeckt blieb, zeigten 9 andere Klone eine Anti-Alphatubulin-Reaktivität über der willkürlichen Spezifitätsschwelle. 2 dieser Klone (B1 und B12) stellen unbekannte Gene dar, G1 ist ein RF(–)-Betatubulin-Klon. H3 ist das GAPDH-positive Kontrollklon von **Fig.** 8 (siehe oben), das bis zu einem gewissen Grad unspezifische Kreuzreaktionen aufweist (Fig. 9B und Fig. 9C), möglicherweise aufgrund einer außergewöhnlich hohen Proteinexpressionsebene. Überraschenderweise exprimieren alle anderen (5) Klone über der Schwelle ribosomale Proteine in einem richtigen Leserahmen (E5, RPL3; H10, RPL18A; E6 und D8, RPS2; F7, RPS3A). Nur ein zusätzliches ribosomales Protein in dem Testset (E3, RPS25) zeigte keine Anti-Alphatubulin-Reaktivität. Das von dem Anti-Alphatubulin-Antikörper erkannte Epitop (YL1/2) (Kilmartin et al., J. Cell Biol. 93 (1982), 576–582) wurde als die die carboxy-terminalen Reste von tyrosiniertem Alphatubulin umfassende lineare Sequenz identifiziert (Wehland et al., EMBO J. 3 (1984), 1295–1300). Gemäß den Autoren sind die Mindestsequenzerfordernisse gemäß Definition in Dipeptidstudien eine negativ geladene Seitenkette in der penultimativen Position und ein aromatischer Rest, der die freie Carboxylatgruppe tragen muss. Da keines der eine Kreuzreaktion aufweisenden ribosomalen Proteine auf unseren Mikroarrays diese Erfordernisse erfüllt, können andere (z.B. strukturelle) Epitope die Antigenspezifität nachahmen.

Tabelle 1

Screening	Klone	GAPDH		HSP90a	
	Kategorie	Nachgewiesen	Gesamt	Nachgewiesen	Gesamt
DNA-Sonde	ABC	206 (237)	80.640	56	80.640
RGS-His-Antikörper	AB	56 (67)	206 (237)	14	56
Spezifischer Antikörper:	A	32 (37)	206 (237)	28 (39)	56
Spezifisch ab falsch (-)	BC	2	18	2 (0)	16
Spezifisch ab falsch (+)	D	2	39	3	32

Tabelle 2

	Positiv gesamt	Positiv sequenziert	Falsch-positiv sequenziert	Falsch-positiv gesamt vorher-gesagt		Falsch-negativ sequenziert	Falsch-negativ gesamt vorher-gesagt		Kommentar
					%			%	
RGS-His/beide	81	41	12	20,1	24,8	1	2	2,5	
RGS-His/GAPDH	63	23	5	17,1	27,1	0	0	0	
RGS-His/HSP	18	18	3	3	16,7	1	2	11,1	
GAPDH 1	206	28	0	0	0	5	32	15,5	5* 206/32=32, Negative, die nicht Ab erkennt mitzählen
GAPDH 2	237	32	0	0	0	0	0	0	
Anti-GAPDH	39	16	2	2	5,1	2	2	5,1	
HSP90alpha	56	36	0	0	0	1	2	3,6	50% der DNA-positiven sind auch mit Ab positiv
Anti-HSP90 1	32	24	3	3	9,4	2	3	9,4	1*24/12 + 1 = 2
Anti-HSP90 2	42	29	2	2	4,8	0	0	0	

Patentansprüche

1. Verfahren zur Identifizierung und/oder Charakterisierung von Clonen aus einer Expressionsbibliothek, wobei die Clone eine gewünschte biologische Eigenschaft verleihen, umfassend die folgenden Schritte:
(a) Analysieren auf die Expression von mindestens einem (Poly)Peptid, exprimiert als Fusionsprotein mit einem Expressionsprodukt eines rekombinanten Inserts eines Clons der Expressionsbibliothek, wobei die Clone der Expressionsbibliothek in einer Anordnung arrangiert sind; und

(b) Inkontaktbringen eines Liganden, der mit einem Polypeptid spezifisch interagiert, das durch das Insert eines Clons exprimiert wird, der die gewünschte biologische Eigenschaft verleiht, mit der Bibliothek oder einer ersten Kopie der Bibliothek von Clonen in einer Anordnung und Analysieren der Clone der Bibliothek auf das Vorliegen einer Interaktion; und/oder
(c) Durchführen einer Hybridisierung oder eines Oligonucleotid-Fingerprints mit einer für das Insert des Clons, der die gewünschte biologische Eigenschaft verleiht, spezifischen Nucleinsäure-Sonde mit der Bibliothek oder einer ersten Kopie oder einer zweiten Kopie der Bibliothek von Clonen, angeordnet in einer Anordnung und Analysieren der Bibliothek von Clonen auf das Vorliegen einer Hybridisierung; und
(d) Identifiziere und/oder Charakterisieren von Clonen, wobei eine Expression des mindestens einen (Poly)Peptids in Schritt (a) und/oder eine Interaktion in Schritt (b) und/oder eine spezifische Hybridisierung oder ein Oligonucleotid-Fingerprint in Schritt (c) nachgewiesen werden kann.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das (Poly)Peptid, welches als Teil eines Fusionsproteins mit dem Expressionsprodukt des rekombinanten Inserts exprimiert wird, ein Antikörper oder ein Fragment oder ein Derivat eines solchen, wobei das Fragment ein $F(ab')_2$, Fab, Fv oder scFv-Fragment ist oder ein Antikörper modifiziert durch Deletion bestimmter Teile davon im Wesentlichen unter Aufrechterhaltung seiner Funktionsfähigkeit als Ligand ist, ein Tag, ein Enzym, ein Phagen-Protein oder ein Fusionsprotein ist.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die Analyse auf die Expression eines (Poly)Peptids in Schritt (a) durchgeführt wird durch Inkontaktbringen eines Liganden, der unterschiedlich von dem Liganden aus Schritt (b) ist, der spezifisch mit dem (Poly)Peptid interagiert, und Analysieren der Bibliothek von Clonen, ob eine spezifische Interaktion vorkommt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Analyse auf die Expression eines (Poly)Peptids in Schritt (a) mit optischen Mitteln, vorzugsweise durch Massenspektrometrie, durchgeführt wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die gewünschte biologische Eigenschaft Spezifität für eine Zelle, ein Gewebe, ein Entwicklungsstadium einer Zelle oder eines Gewebes, einen Mikroorganismus, vorzugsweise ein Bakterium, eine Pflanze oder ein Organismus ist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Zelle oder das Gewebe eine normale Zelle oder normales Gewebe, eine erkrankte Zelle oder erkranktes Gewebe oder eine vorbehandelte Zelle oder vorbehandeltes Gewebe ist.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Clone transformierte Bakterien, rekombinante Phagen, oder transformierte Zellen von Säugern, Insekten, Pilzen, Hefen oder Pflanzen sind.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Anordnung im Wesentlichen jener in den Schritten (a) bis (c) entspricht.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Anordnung einem Gitter entspricht.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei das Gitter die Größenordnung einer Mikrotiterplatte, eines Silika-Wafers, eines Chips, eines massenspektrometrischen Targets oder einer Matrix besitzt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Clone auf einem festen Träger fixiert sind.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei der feste Träger ein Filter, eine Membran, ein magnetisches Kügelchen, ein Silika-Wafer, Glas, Metall, ein Chip, ein massenspektrometrisches Target oder eine Matrix ist.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei mindestens einer der Liganden ein (Poly)Peptid, ein Phage oder ein Fragement davon, Blut, Serum, ein Toxin, ein Inhibitor, ein Wirkstoff oder ein Wirkstoff-Kandidat, ein nicht proteinartiger oder zum Teil proteinartiger Rezeptor, ein katalytisches Polymer, ein Enzym, eine Nucleinsäure, eine PNA, ein Virus oder ein Teil davon, eine Zelle oder ein Teil davon, eine anorganische Verbindung, ein Konjugat, ein Farbstoff, ein Gewebe oder ein Konjugat des Liganden ist.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei das (Poly)Peptid ein Antikörper oder ein Fragment oder Derivat davon, ein Hormon oder ein Fragment davon oder ein Enzym oder ein Fragment oder ein Derivat davon ist.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Interaktion in Schritt (b) eine spezifische In-

teraktion ist.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Interaktion in Schritt (b) eine unspezifische Interaktion ist.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei die Hybridisierung in Schritt (c) unter stringenten Bedingungen zustande kommt.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei die Hybridisierung in Schritt (c) unter nicht-stringenten Bedingungen zustande kommt.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 18, wobei das Tag c-myc, His-Tag, FLAG, alkalische Phosphatase, EpiTAG^{TM}, VS-Tag, T7-Tag, Xpress^{TM}-Tag oder Strep-Tag, ein Fusionsprotein, vorzugsweise GST, eine Cellulose-bindende Domäne, grünfluoreszierendes Protein, Maltose bindendes Protein oder lacZ ist.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, wobei die Bibliothek von Clonen eine cDNA-Bibliothek umfasst.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, wobei die Anordnung der Bibliothek und/oder die Kopien mit einer automatischen Vorrichtung hergestellt wird/werden.

22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei die automatische Vorrichtung ein Sortierautomat und/oder ein Tropfenautomat und/oder ein Rasterautomat ist.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 22, darüber hinaus umfassend die Sequenzierung des Nucleinsäureinserts des gewünschten Clons.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 22, darüber hinaus umfassend die Identifizierung und/oder Charakterisierung des (Poly)Peptids, das von dem Insert des gewünschten Clons codiert wird.

25. Kit umfassend mindestens zwei Kopien von Expressionsbibliotheken, wobei mindestens ein (Poly)petid ist exprimiert als ein Fusionsprotein mit einem rekombinanten Insert eines Clons einer solchen Expressionsbibliothek und Klone dieser Expressionsbibliothek eine gewünschte Eigenschaft verleihen, fixiert an einen festen Träger, wobei die Klone dieser Expressionsbibliothek in Gitterform angeordnet sind.

26. Kit nach Anspruch 25, wobei eine der Kopien (Poly)Peptide umfasst, die durch Inserts dieser Clone exprimiert werden, und eine weitere Kopie eine genomische oder cDNA-Bibliothek umfasst.

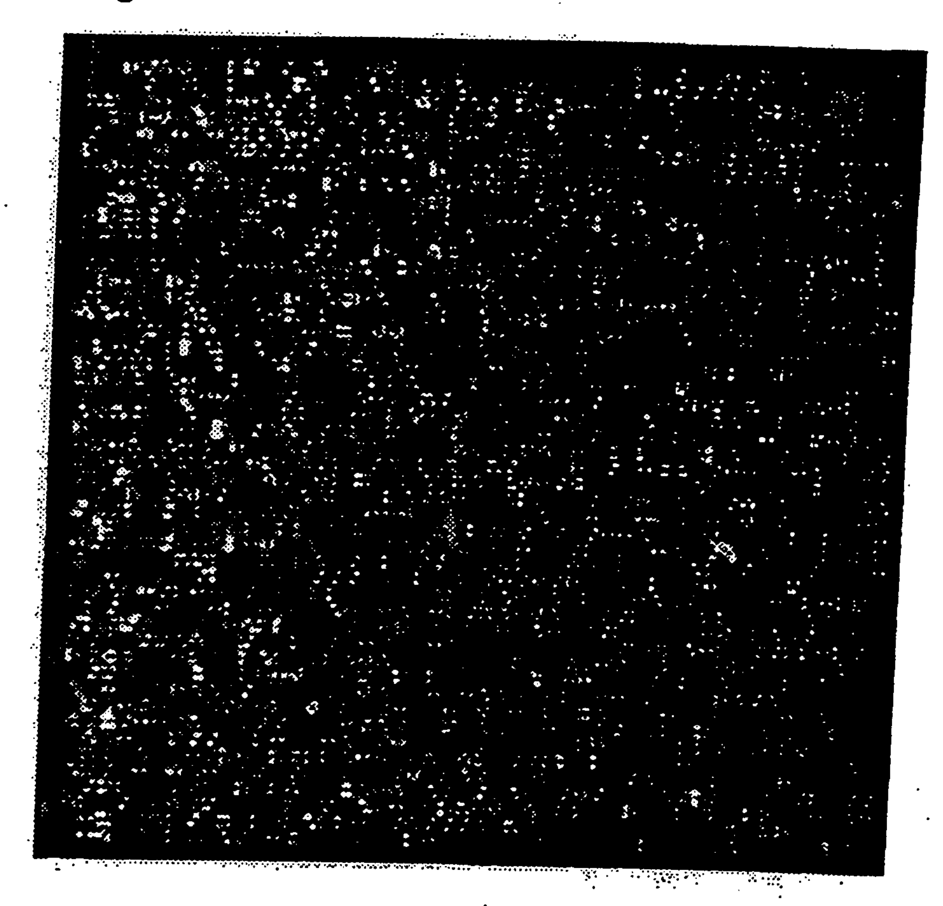
27. Eine Anordnung umfassend eine Expressionsbibliothek aus Clone, wobei mindestens ein (Poly)petid ist exprimiert als ein Fusionsprotein mit einem rekombinanten Insert eines Clons einer solchen Expressionsbibliothek und Klone dieser Expressionsbibliothek eine gewünschte Eigenschaft verleihen, wobei die angeordnete Form eine Gitterform ist.

Es folgen 15 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



Fig. 1



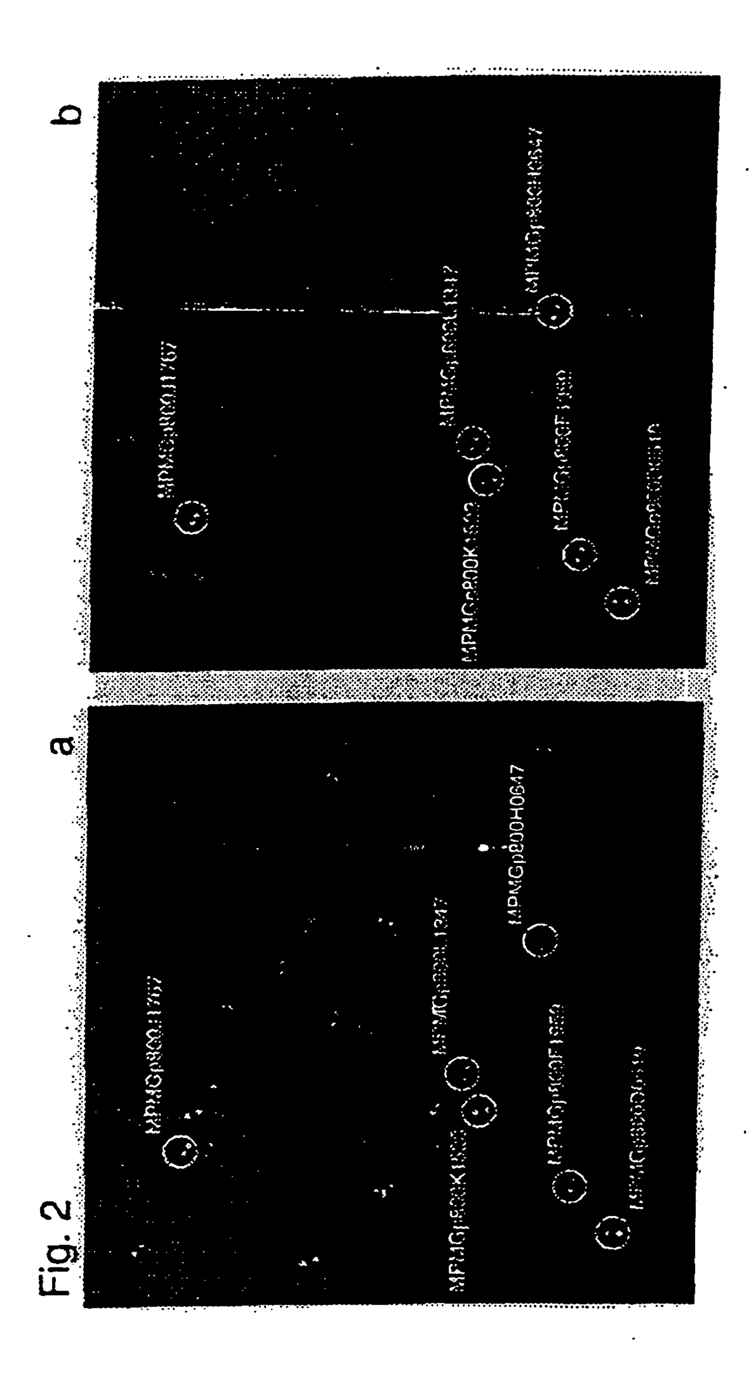


Fig. 2

Fig. 3

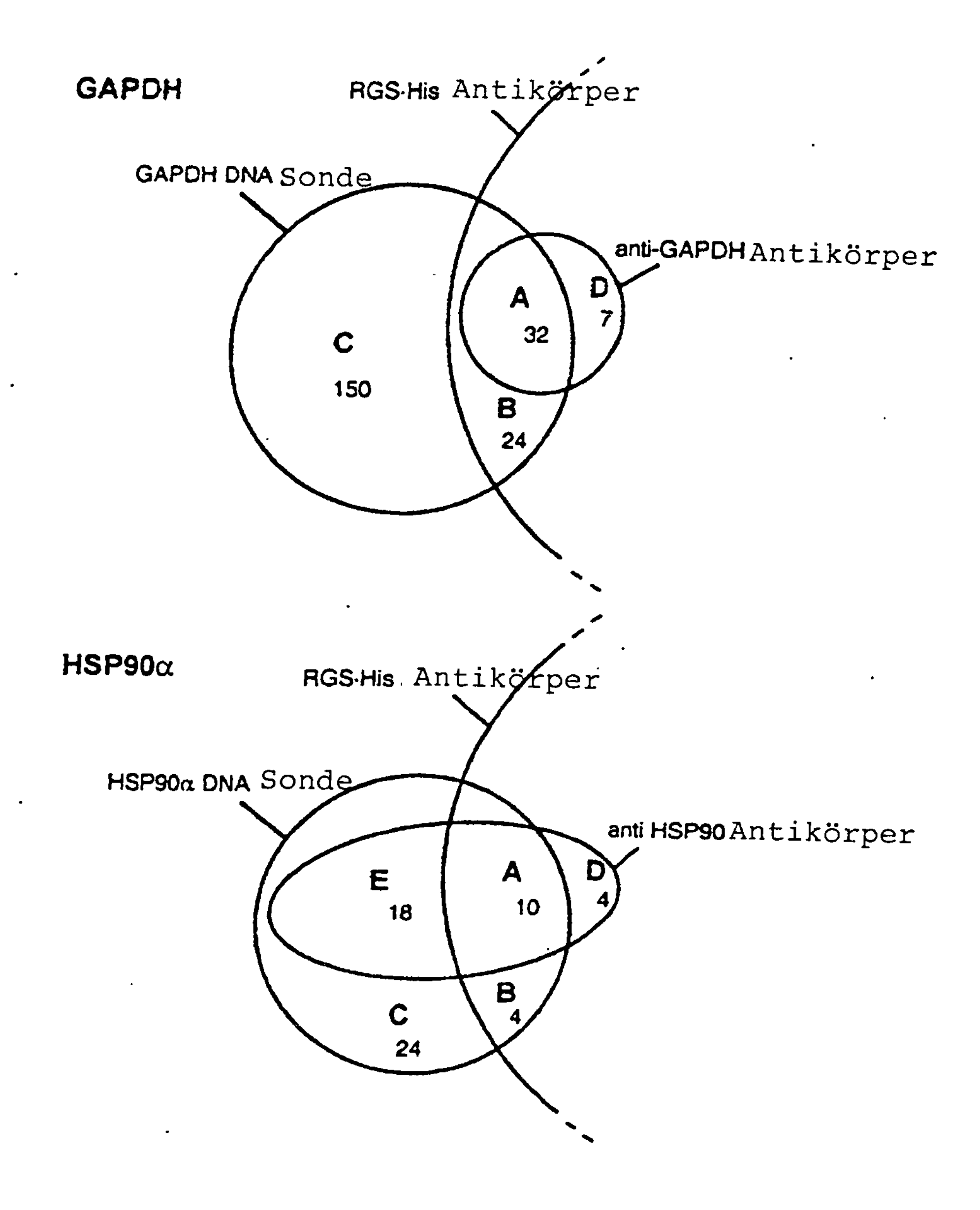
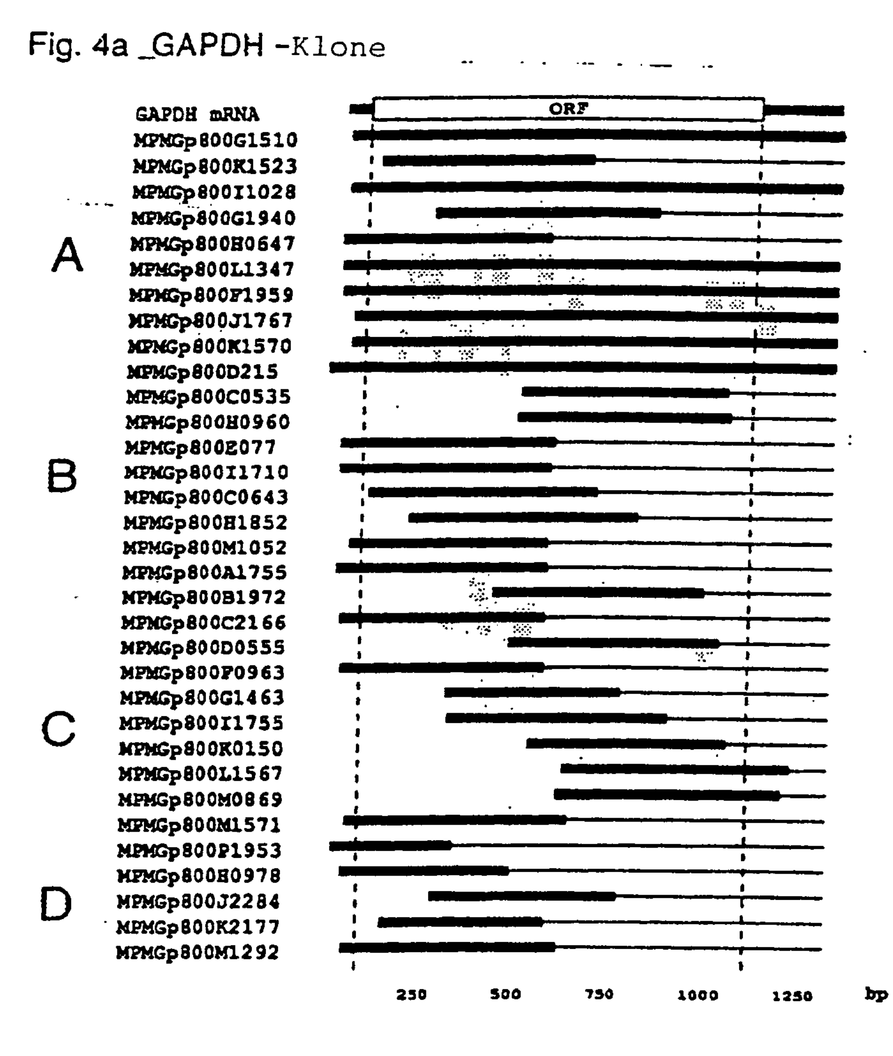

GAPDH
RGS-His Antikörper
GAPDH DNA Sonde
anti-GAPDH Antikörper
A
32
B
24
C
150
D
7
HSP90α
RGS-His Antikörper
HSP90α DNA Sonde
anti HSP90 Antikörper
E
18
A
10
D
4
B
4
C
24

Fig. 4a _GAPDH -Klone



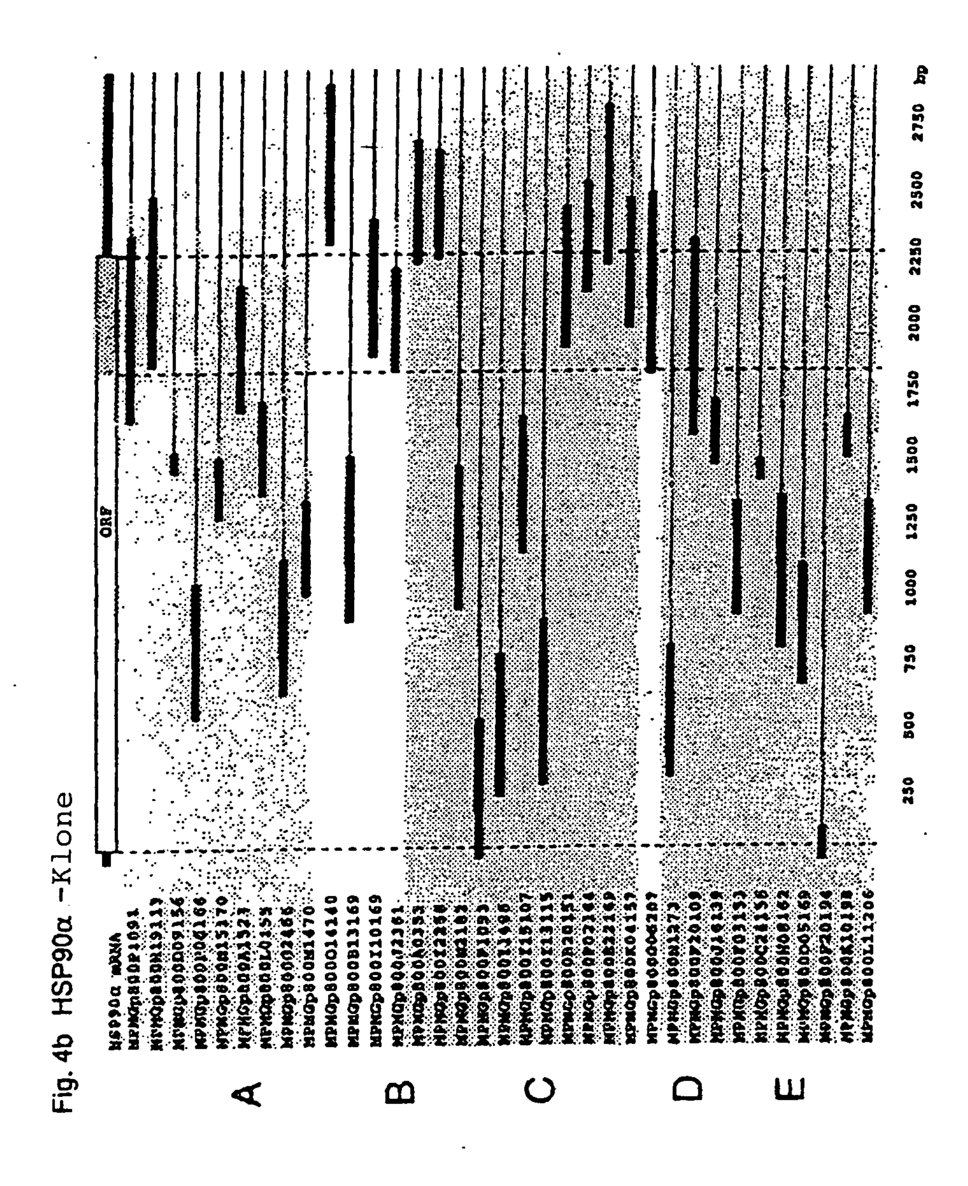


Fig. 4b HSP90α -Klone

Fig. 5a

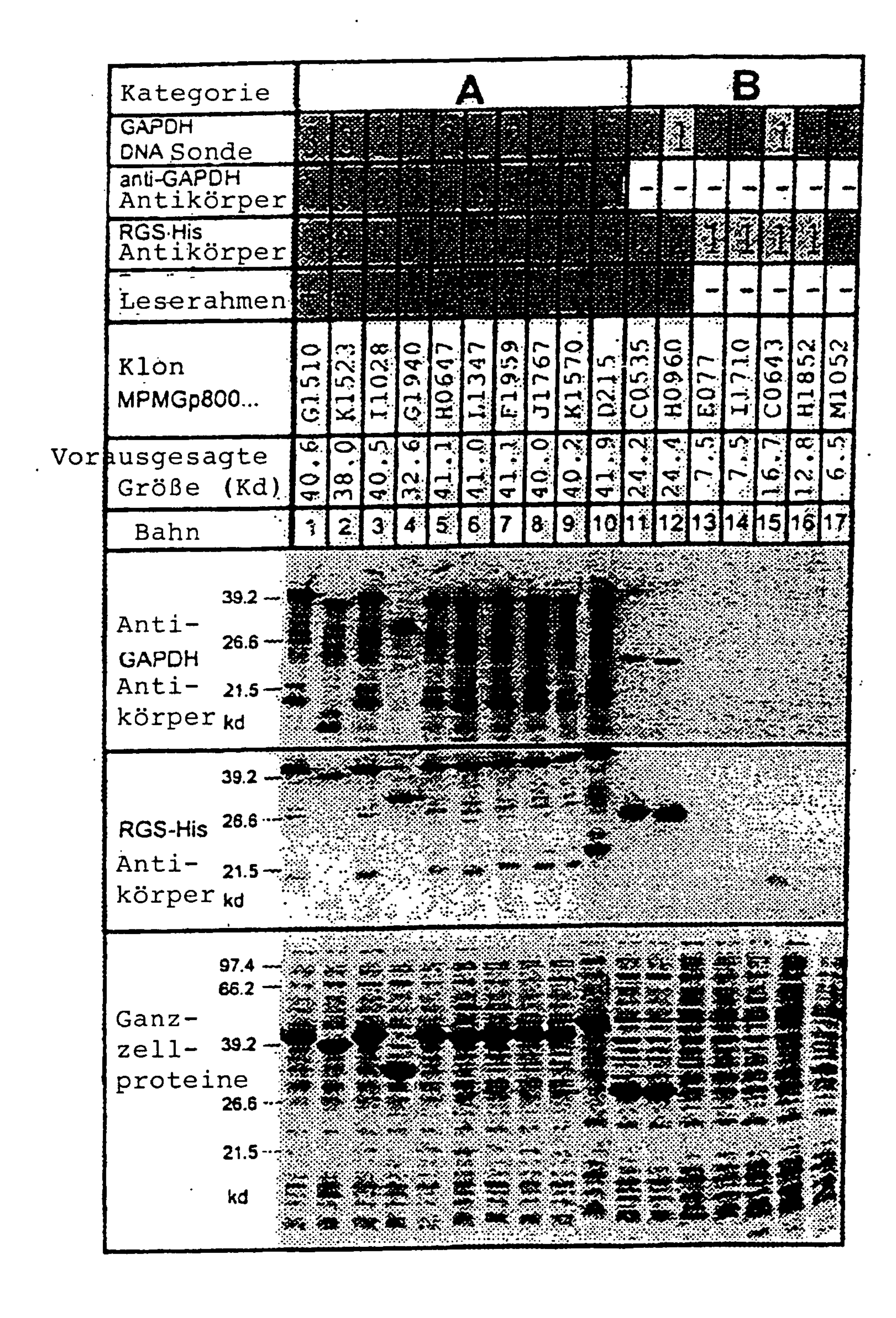
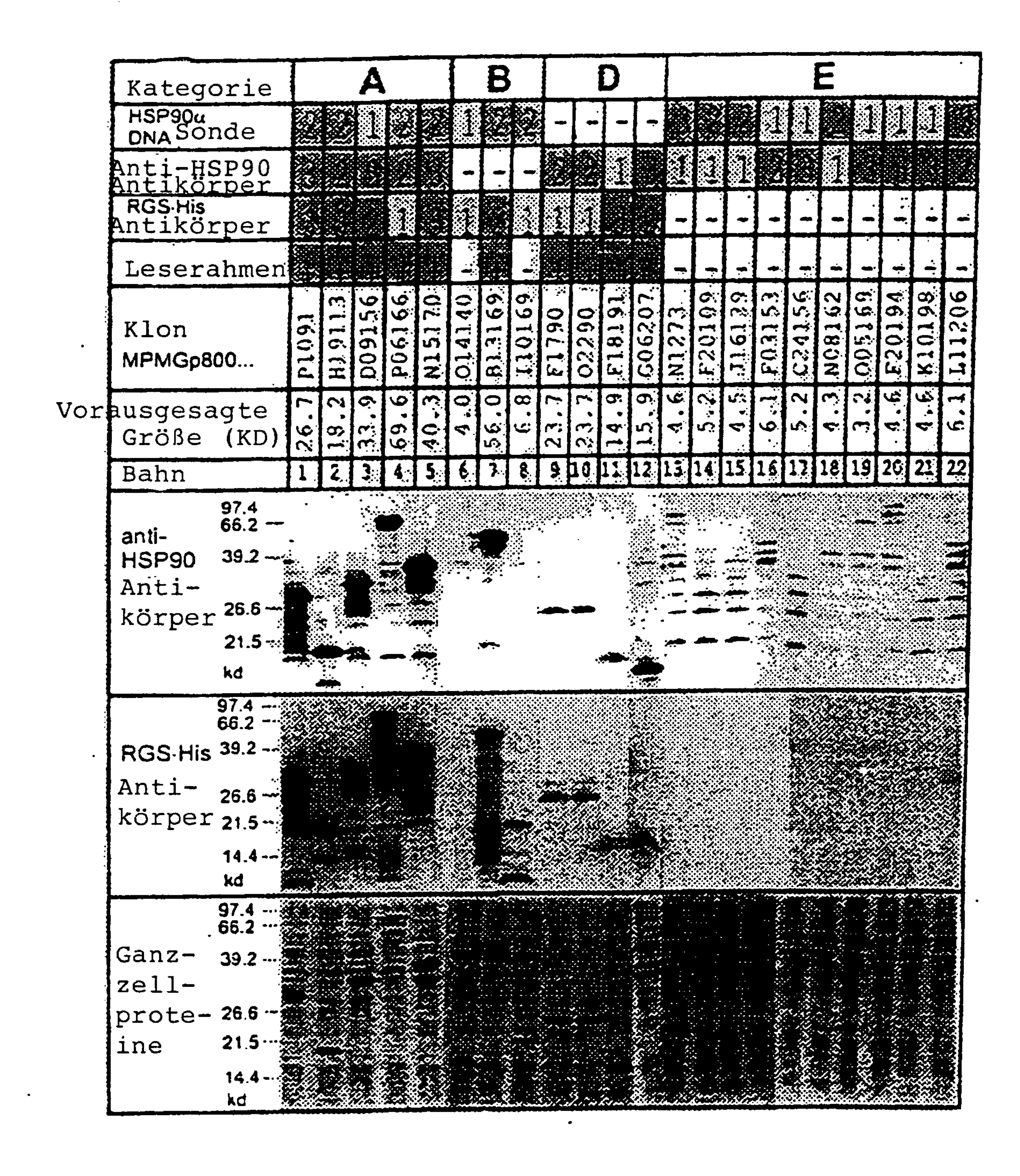

Kategorie
A
B
GAPDH DNA Sonde
anti-GAPDH Antikörper
RGS-His Antikörper
Leserahmen
Klon MPMGp800...
G1510
K1523
I1028
G1940
H0647
L1347
F1959
J1767
K1570
D215
C0535
H0960
E077
I1710
C0643
H1852
M1052
Vorausgesagte Größe (Kd)
40.6
38.0
40.5
32.6
41.1
41.0
41.1
40.0
40.2
41.9
24.2
24.4
7.5
7.5
16.7
12.8
6.5
Bahn
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Anti-GAPDH Anti-körper
39.2
26.6
21.5
kd
RGS-His Anti-körper
39.2
26.6
21.5
kd
Ganz-zell-proteine
97.4
66.2
39.2
26.6
21.5
kd

Fig. 5b


Kategorie
A
B
D
E
HSP90α DNA Sonde
Anti-HSP90 Antikörper
RGS·His Antikörper
Leserahmen
Klon MPMGp800...
P1091
H19113
D09156
P06166
N15170
O14140
B13169
I10169
F1790
O2290
F18191
G06207
N1273
F20199
J16139
F03153
C24156
NC8162
O05169
F20194
K10198
L11206
Vorausgesagte Größe (KD)
26.7
19.2
33.9
69.6
40.3
4.0
56.0
6.8
23.7
23.7
14.9
15.9
4.6
5.2
4.5
6.1
5.2
4.3
3.2
4.6
4.6
6.1
Bahn
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
anti-HSP90 Antikörper
97.4
66.2
39.2
26.6
21.5
kd
RGS·His Antikörper
97.4
66.2
39.2
26.6
21.5
14.4
kd
Ganzzellproteine
97.4
66.2
39.2
26.6
21.5
14.4
kd

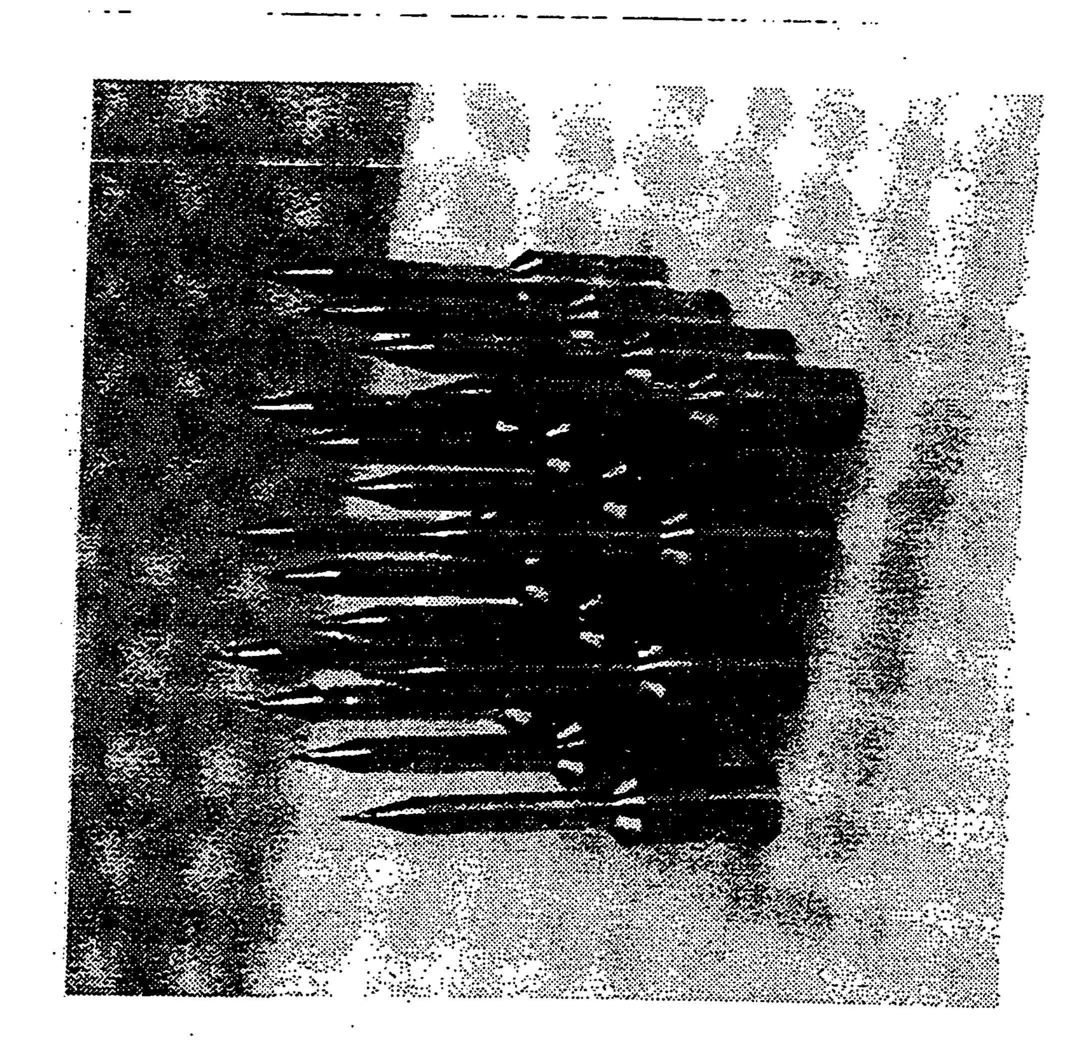


Fig. 6

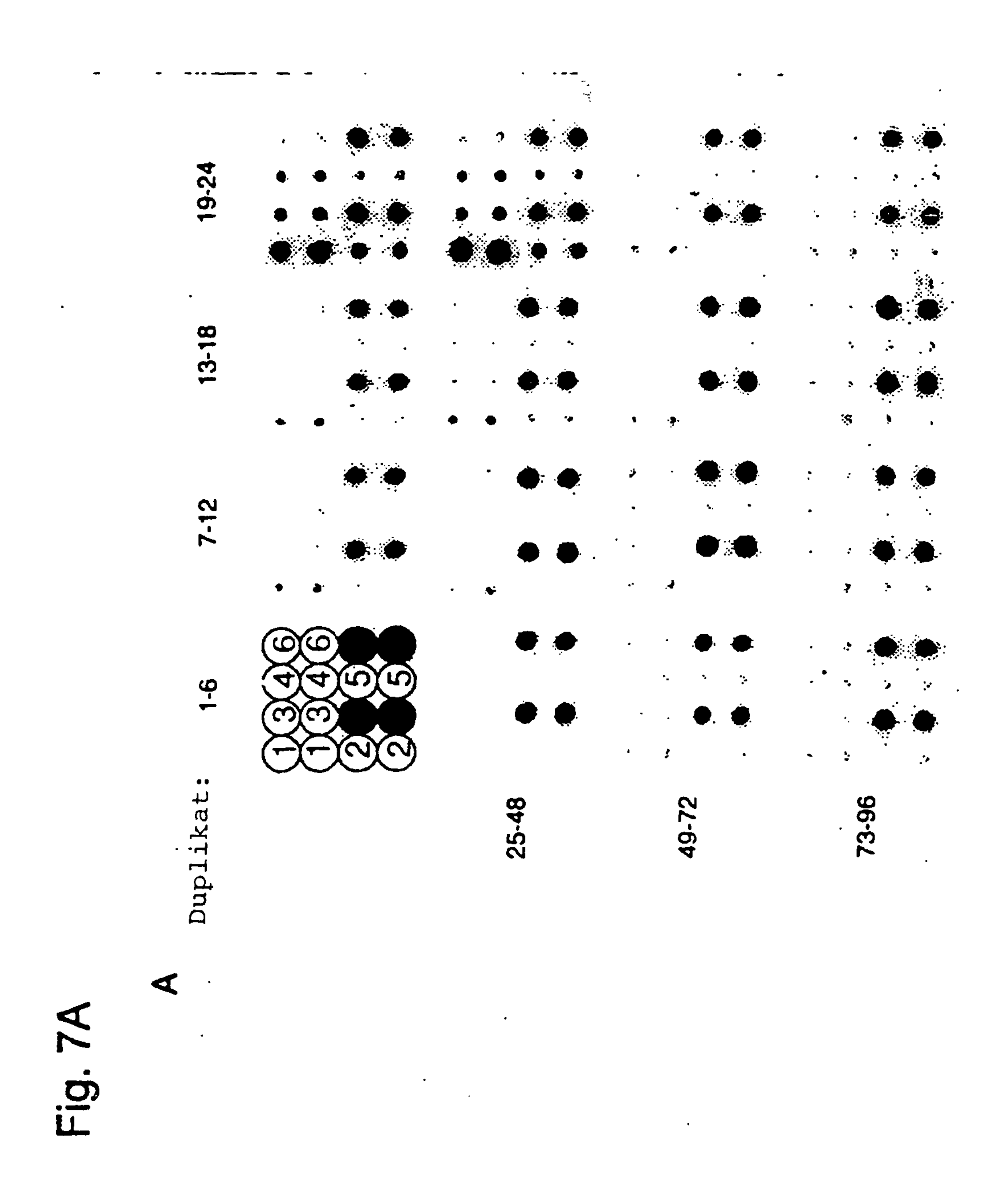


Fig. 7A

Fig. 7B

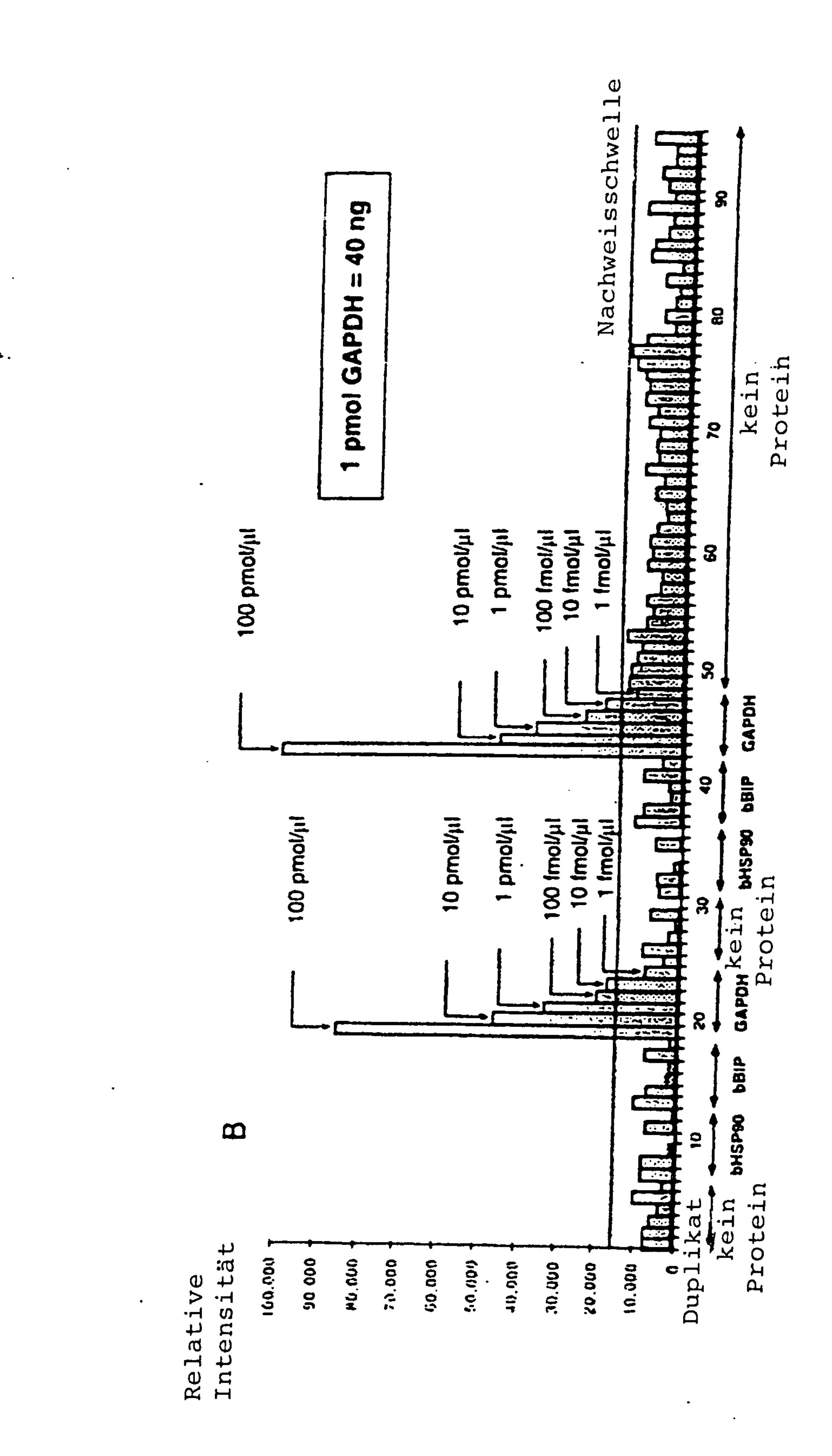

B
Relative Intensität
1 pmol GAPDH = 40 ng
100 pmol/µl
10 pmol/µl
1 pmol/µl
100 fmol/µl
10 fmol/µl
1 fmol/µl
Nachweisschwelle
0
10.000
20.000
30.000
40.000
50.000
60.000
70.000
80.000
90.000
100.000
Duplikat
kein Protein
bHSP90
bBIP
GAPDH
10
20
30
40
50
60
70
80
90

Fig. 8A

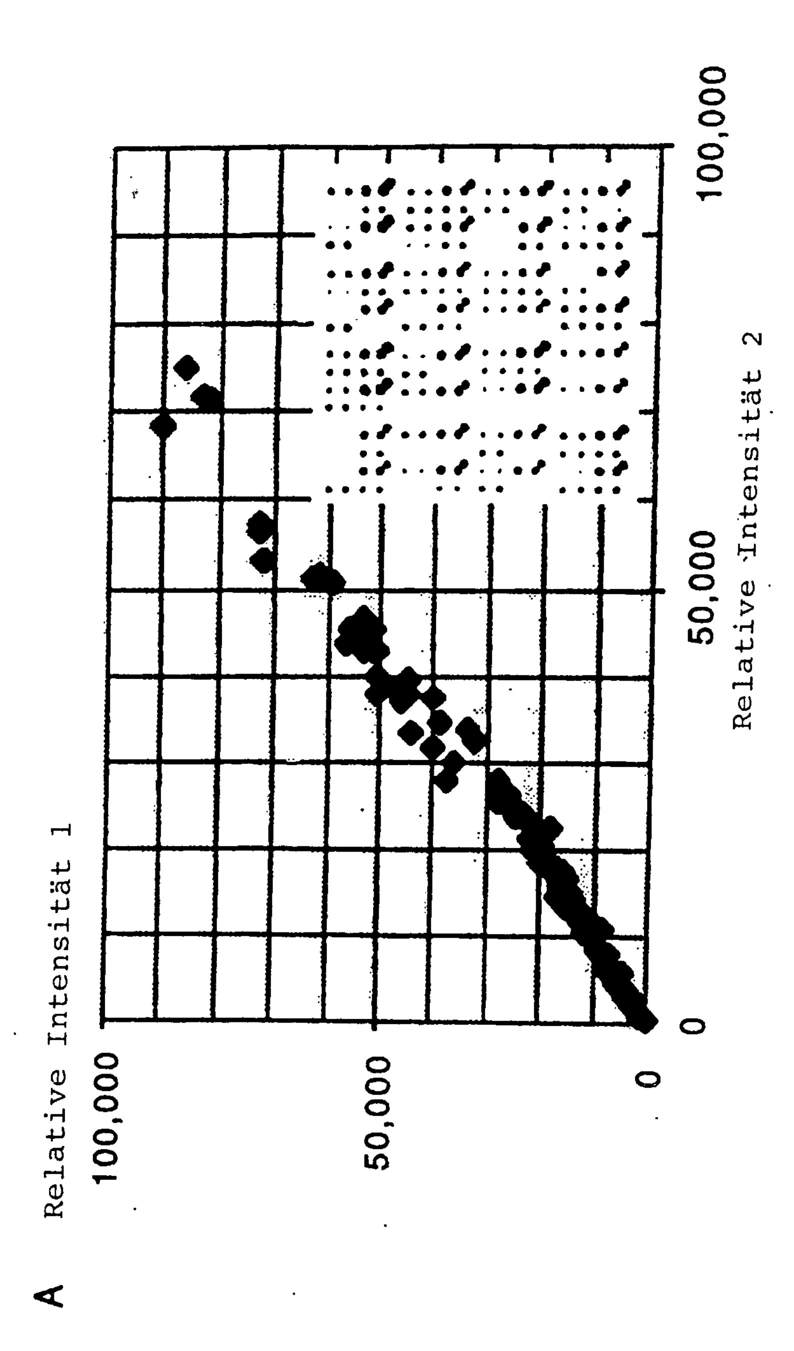

A
Relative Intensität 1
100,000
50,000
0
0
50,000
100,000
Relative Intensität 2

Fig. 8B

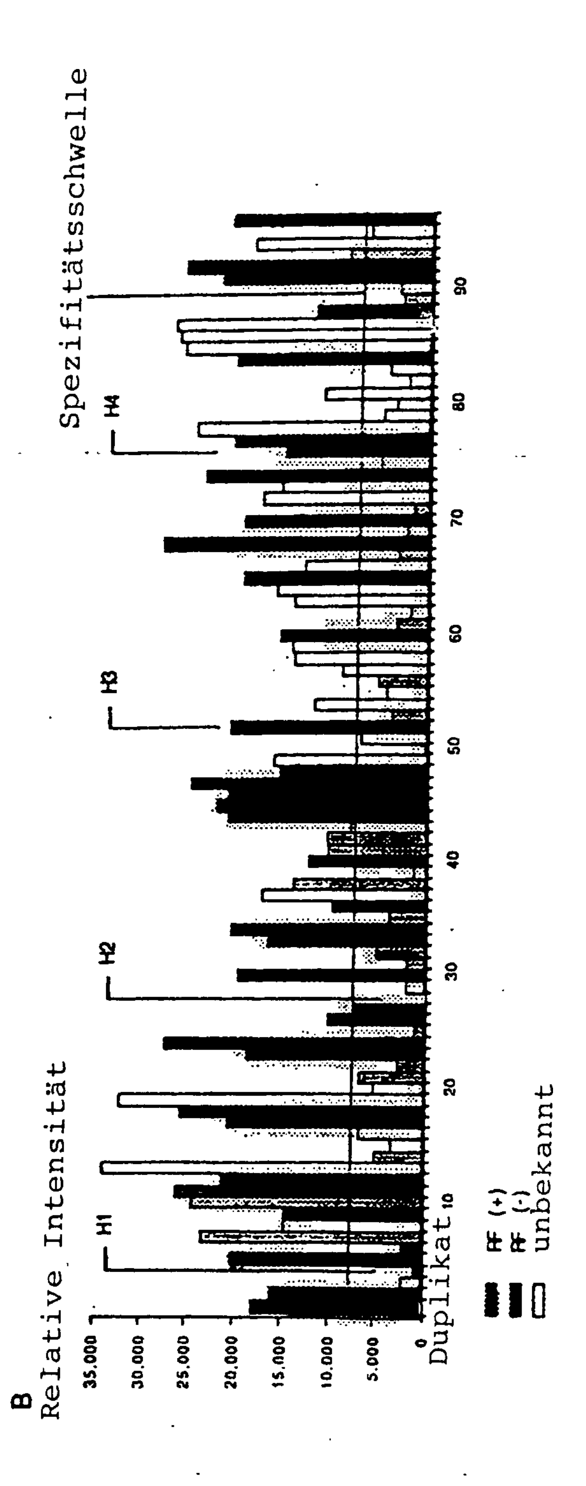

B
Relative Intensität
35.000
30.000
25.000
20.000
15.000
10.000
5.000
0
Duplikat
10
20
30
40
50
60
70
80
90
H1
H2
H3
H4
Spezifitätsschwelle
RF (+)
RF (-)
unbekannt

Fig. 9A

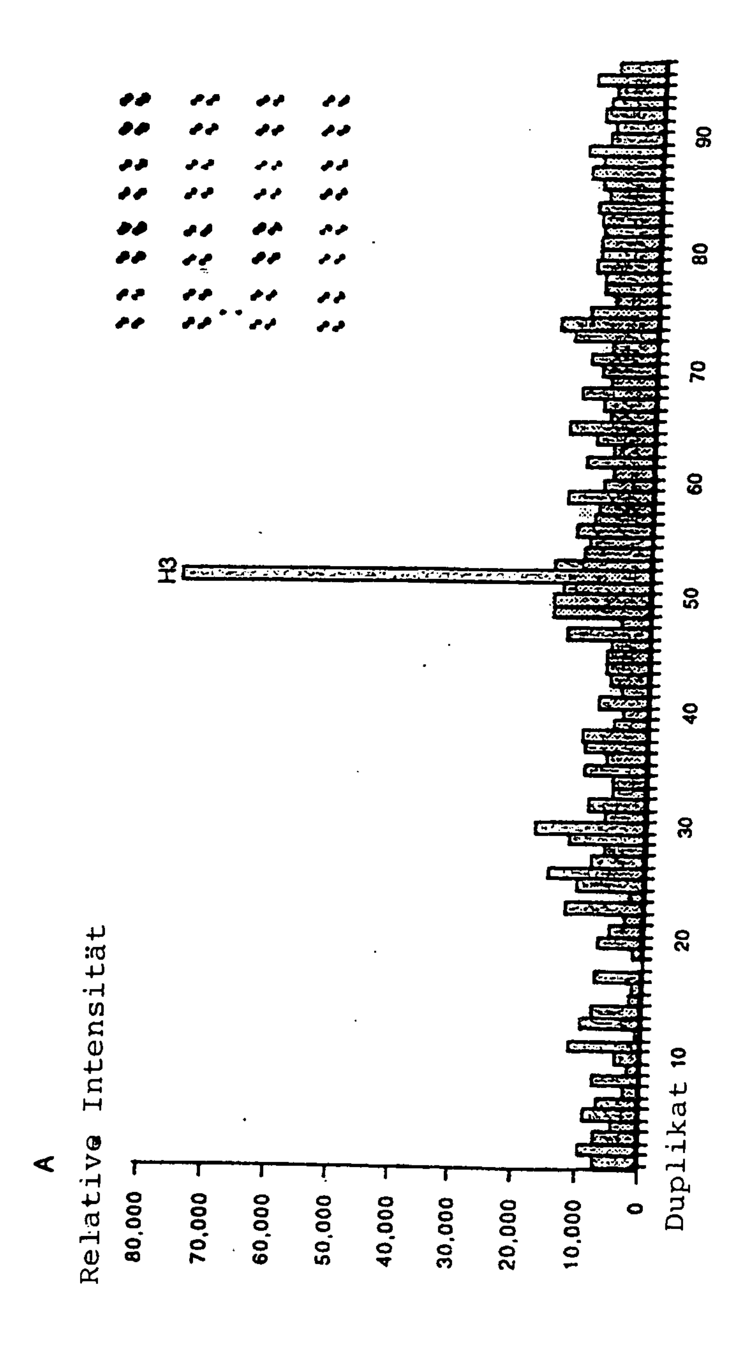

A
Relative Intensität
80,000
70,000
60,000
50,000
40,000
30,000
20,000
10,000
0
Duplikat
10
20
30
40
50
60
70
80
90
H3

Fig. 9B

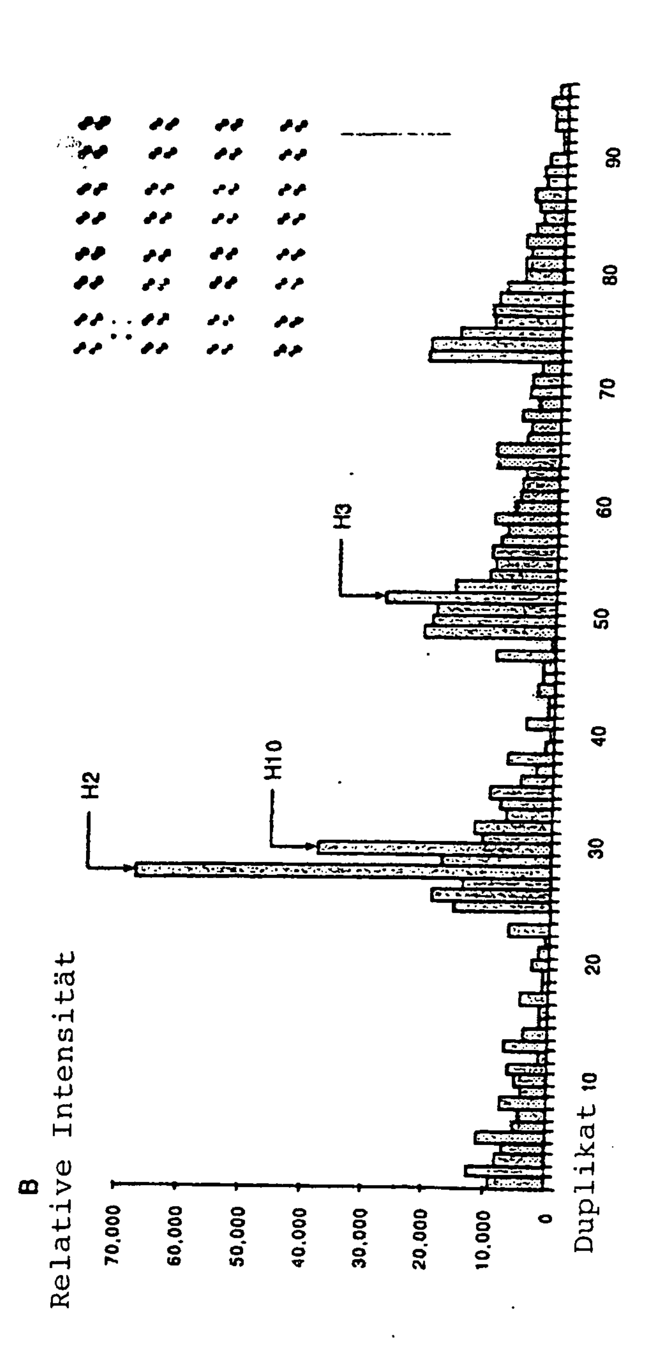
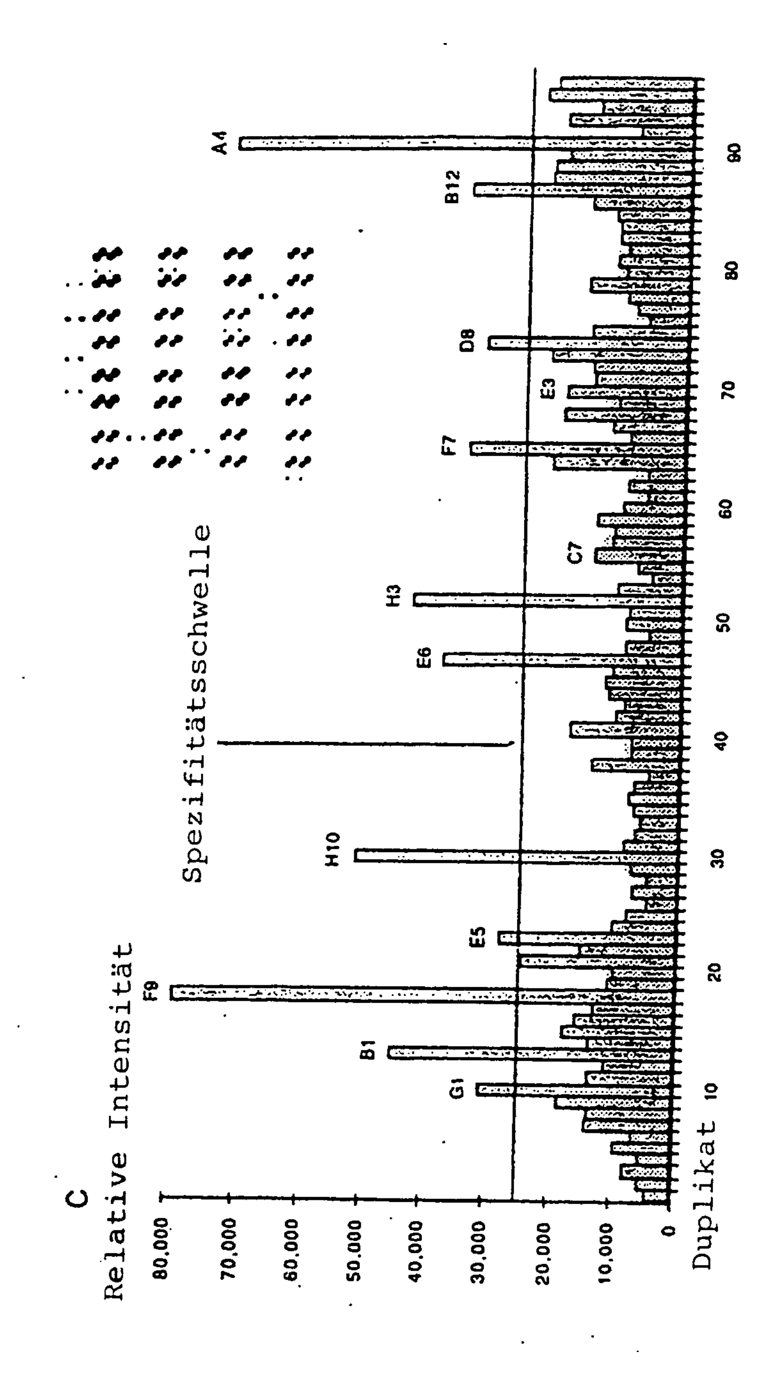

B
Relative Intensität
70,000
60,000
50,000
40,000
30,000
20,000
10,000
0
Duplikat
10
20
30
40
50
60
70
80
90
H2
H10
H3

Fig. 9C


C
Relative Intensität
80,000
70,000
60,000
50,000
40,000
30,000
20,000
10,000
0
Duplikat
10
20
30
40
50
60
70
80
90
Spezifitätsschwelle
G1
B1
F9
E5
H10
E6
H3
C7
F7
E3
D8
B12
A4